

Travail de l'Institut Bactériologique de Lyon

---

Etude comparée  
des Méthodes de Titration  
des Sérums Antidiphtériques  
(Titrages effectués à l'Institut Bactériologique de Lyon)

---

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

*et soutenue publiquement le 14 Novembre 1932*

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

**Henri DURRIEU de MADRON**

*Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire*

*Diplômé d'Hygiène et de Microbiologie*

Né le 17 Juin 1906, à MIREPOIX (Ariège)



LYON

BOSC Frères, M. et L. RIOU

IMPRIMEURS-ÉDITEURS

---

1932



**ÉTUDE COMPARÉE des MÉTHODES de TITRAGE  
DES SÉRUMS ANTIDIPHTÉRIQUES**  
(Titrages effectués à l'Institut Bactériologique de Lyon)



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

Travail de l'Institut Bactériologique de Lyon

---

Etude comparée  
des Méthodes de Titration  
des Sérums Antidiphtériques  
(Titrages effectués à l'Institut Bactériologique de Lyon)

---

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

*et soutenue publiquement le 14 Novembre 1932*

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

**Henri DURRIEU de MADRON**

*Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire*

*Diplômé d'Hygiène et de Microbiologie*

Né le 17 Juin 1906, à MIREPOIX (Ariège)



LYON

BOSC Frères, M. et L. RIOU

IMPRIMEURS-ÉDITEURS

# PERSONNEL DE LA FACULTÉ

|                       |                 |
|-----------------------|-----------------|
| Doyen honoraire ..... | M. L. HUGOUNENQ |
| Doyen .....           | M. J. LEPINE    |
| Assesseur .....       | M. X...         |

## PROFESSEURS HONORAIRES

MM. CAZENEUVE, ROQUE, LANNOIS, HUGOUNENQ, ROCHET, BARRAL, ROLLET.

## PROFESSEURS

|                                                           |                                    |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Cliniques médicales .....                                 | MM. PIC                            |
| Cliniques chirurgicales .....                             | PAVIOT                             |
| Clinique obstétricale et Accouchements .....              | TIXIER                             |
| Clinique ophtalmologique .....                            | BERARD                             |
| Clinique des maladies cutanées et syphilitiques .....     | VORON                              |
| Clinique neurologique et psychiatrique .....              | BONNET, agrégé,<br>chargé de cours |
| Clinique des maladies des enfants .....                   | NICOLAS                            |
| Clinique des maladies des femmes .....                    | LEPINE (J.)                        |
| Clinique d'oto-rhino-laryngologie .....                   | MOURIQUAND                         |
| Clinique des maladies des voies urinaires .....           | VILLARD                            |
| Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie .....      | COLLET                             |
| Clinique et prophylaxie de la tuberculose .....           | GAYET                              |
| Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie .....   | NOVE-JOSSERAND                     |
| Chimie biologique et médicale .....                       | COURMONT                           |
| Chimie organique et Toxicologie .....                     | CLUZET                             |
| Matière médicale et Botanique .....                       | FLORENCE                           |
| Parasitologie et Histoire naturelle médicale .....        | MOREL                              |
| Anatomie .....                                            | MANCEAU                            |
| Histologie .....                                          | GUIART                             |
| Physiologie .....                                         | LATARJET                           |
| Pathologie externe .....                                  | POLICARD                           |
| Pathologie interne .....                                  | DOYON                              |
| Pathologie et Thérapeutique générales .....               | LERICHE                            |
| Anatomie pathologique .....                               | FROMENT                            |
| Chirurgie opératoire .....                                | CADE                               |
| Médecine expérimentale et comparée et bactériologie ..... | FAVRE                              |
| Médecine légale .....                                     | PATEL                              |
| Hygiène .....                                             | ARLOING (F.)                       |
| Thérapeutique .....                                       | Etienne MARTIN                     |
| Pharmacie et Pharmacologie .....                          | ROCHAIX                            |
| Hydrologie thérapeutique et climatologie .....            | SAVY                               |
|                                                           | LEULIER                            |
|                                                           | PIERY                              |

## PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

|                                                         |                 |
|---------------------------------------------------------|-----------------|
| Chargé d'un cours de Propédeutique de gynécologie ..... | MM. CONDAMIN    |
| Chargé d'un cours d'Anatomie médico-chirurgicale .....  | THEVENOT (Léon) |
| Chargé d'un cours d'Embryologie .....                   | NOEL            |

## CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

|                               |               |
|-------------------------------|---------------|
| Chirurgie expérimentale ..... | MM. TAVERNIER |
| Stomatologie .....            | PONT          |

## AGREGES

|                  |                 |             |               |
|------------------|-----------------|-------------|---------------|
| MM.              | MM.             | MM.         | MM.           |
| NOGIER           | DUFOURT         | DECHAUME    | MORENAS       |
| RHENTER          | DEVIC           | BERNHEIM    | REBATTU Ch.   |
| MAZEL            | GABRIELLE       | POLLOSSON   | REVOL Ch.     |
| SANTY            | MARTIN (Joseph) | CHAMBON     | ENSELME Ch.   |
| CHALIER (André)  | ROCHET (Ph.)    | CIRERT      | SEDALLIAN Ch. |
| CHALIER (Joseph) | WERTHEIMER      | EPARVIER    |               |
| DUMAS            | GATE            | GUILLEMINET |               |

## EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. COURMONT, président ; CORDIER, assesseur ;

REBATTU et SÉDALLIAN



*La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.*

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

A MA FEMME

A MON FRÈRE ET A SA FAMILLE

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR PAUL COURMONT

*Professeur de Clinique Phtysiologique  
et d'Hygiène de la Tuberculose*

*Directeur de l'Institut Bactériologique de Lyon*

*Médecin des Hôpitaux*

*Officier de la Légion d'Honneur*

Nous le prions de vouloir bien accepter l'hommage de notre respectueuse gratitude pour le grand honneur qu'il nous fait en acceptant la présidence de notre thèse.

A MONSIEUR LE DOCTEUR P. SEDALLIAN

*Chargé de Cours d'Hygiène à la Faculté  
Chef de Service à l'Institut Bactériologique de Lyon*

Il nous a inspiré le sujet de cette thèse et très obligeamment guidé de ses conseils éclairés au cours de son élaboration.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance et nos très vifs remerciements.

A NOS JUGES

A MES MAÎTRES  
DE L'ÉCOLE ANNEXE DE MÉDECINE NAVALE DE TOULON

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE  
ET DES HÔPITAUX DE MONTPELLIER

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE LYON

A MES MAÎTRES  
DES HÔPITAUX CIVILS ET MILITAIRES DE LYON

A MES MAÎTRES ET A MES CHEFS  
DE L'ÉCOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE

# ETUDE COMPARÉE des MÉTHODES de TITRAGE DES SERUMS ANTIDIPHTÉRIQUES

(Titrages effectués à l'Institut Bactériologique de Lyon)

---

## INTRODUCTION

A la suite des travaux et des expériences de PASTEUR, de nombreux essais furent tentés dans le but d'obtenir l'immunisation de certains animaux contre diverses maladies infectieuses. Plus tard, lorsque l'on eut découvert que certains microbes agissaient, moins par leur présence que par les poisons (toxines) qu'ils pouvaient sécréter dans le milieu sur lequel ils se trouvaient, on essaya également d'obtenir « l'état réfractaire », mais en utilisant, dans ce but, les propres poisons sécrétés par les microbes. SALMON, CHARRIN, etc., parvinrent à immuniser des animaux en introduisant dans leur organisme, d'abord des toxines à pouvoir toxique faible (atténuées par la chaleur ou par tout autre procédé), puis des toxines pures en très faible quantité; enfin, progressivement, des quantités de plus en plus grandes de toxines douées de toute leur activité.

Les travaux de RICHET et HÉRICOURT, puis ceux de BEHRING, inaugurent la sérothérapie. D'abord appliquée au tétanos, c'est dans ses rapports avec la théra-

peutique antidiphtérique qu'elle devait bientôt présenter le plus grand intérêt. En effet, lorsque Roux et YERSIN eurent découvert la toxine diphtérique, les notions précédentes appliquées à l'étude de la diphtérie conduisirent à la découverte de la sérumthérapie de cette maladie. Les premières tentatives d'immunisation d'animaux sont l'œuvre de FRANKEL, qui immunise des cobayes, en leur injectant de la toxine chauffée à 70°. D'autres auteurs obtinrent des résultats identiques avec des procédés différents (mélange de toxine et de trichlorure d'iode. (BEHRING, etc.) C'est en étudiant les conditions de cette immunité que BEHRING et KITASATO mirent en lumière les propriétés du sang des animaux immunisés contre la diphtérie. Le sang de tels animaux est capable de détruire « in vivo » et « in vitro » le poison diphtérique. Cette propriété persiste dans le sérum du sang débarrassé de tout élément cellulaire. Si on recueille le sérum du sang d'un animal immunisé, une dose mortelle de toxine mélangée « in vitro » à ce sérum perd son pouvoir pathogène et devient inactive. Ce sérum est préventif et curatif chez les lapins et les cobayes intoxiqués avec la toxine diphtérique ou inoculés avec le bacille de Loeffler vivant.

Cependant, la méthode restait peu pratique pour les raisons suivantes : Le sérum était préparé par immunisation de petits animaux de laboratoire, d'où (outre la difficulté d'obtenir cette immunisation) la faible quantité de sérum obtenue. De plus, il était difficile d'obtenir en abondance une toxine très active. La sérothérapie antidiphtérique restait donc un moyen

d'action précaire. C'est alors que, grâce aux travaux de ROUX et MARTIN, elle entra dans une phase nouvelle. En collaboration avec L. MARTIN, ROUX put obtenir une toxine très puissante avec laquelle il immunisa des chevaux. ROUX fit connaître (Congrès d'Hygiène de Budapest, 1894) les résultats obtenus par l'emploi du sérum ainsi préparé, et, dès lors, la sérothérapie entra dans la pratique courante. Depuis, son efficacité ne s'est pas démentie.

#### PROPRIÉTÉS DU SÉRUM ANTIDIPHTÉRIQUE

Le sérum des animaux immunisés est antitoxique. Il neutralise la toxine diphtérique lorsqu'on le mélange avec celle-ci en quantité convenable. Cette propriété du sérum est due à une substance spéciale, l'antitoxine, que l'organisme sécrète sous l'influence de la toxine.

L'immunité conférée par le sérum est rapide, mais transitoire. Le sérum antitoxique n'est pas bactéricide, il ne renferme pas de sensibilisatrices. Il possède faiblement, et d'une façon très inconstante, la propriété agglutinante. L'antitoxine possède la propriété de neutraliser la toxine « in vivo » et « in vitro ».

Le sérum se montre préventif et thérapeutique chez les animaux inoculés avec une culture vivante, propriété qui se manifeste encore quand le sérum est injecté huit heures après le virus; mais il faut alors des doses très élevées de sérum.

La quantité de sérum nécessaire pour guérir un animal qui a reçu de la toxine, dépend : du poids de

l'animal, de la quantité et de l'activité de la toxine employée, de l'activité du sérum, de la précocité du traitement. Il est donc important de connaître l'activité du sérum que l'on emploie, et c'est dans ce but que l'on a essayé d'établir des règles pour juger de cette activité. La question du titrage des sérums soulève donc des problèmes dont l'intérêt est considérable, non seulement au point de vue théorique, mais encore au point de vue pratique.

Ce travail a pour but de présenter les titrages effectués à l'Institut Bactériologique de Lyon. Un certain nombre de sérums antidiphtériques ont été titrés comparativement par les deux méthodes de titrage actuellement utilisées : la méthode d'Ehrlich et la méthode de Ramon. Nous n'avons retenu pour notre thèse que ces derniers. Nous n'avons relevé, ni les titrages où, seule, la méthode de Ramon a été employée, ni ceux où, seule, la méthode d'Ehrlich a été utilisée. Avant d'aborder l'étude comparative des deux techniques telles qu'elles ont été mises en œuvre à l'Institut Bactériologique de Lyon, nous exposons les principes et les divers moyens proposés pour titrer expérimentalement les sérums :

La méthode de Roux ;

La méthode d'Ehrlich ;

La méthode de flocculation de Ramon ;

La recherche de « l'avidité » de Kraus, Madsen et Schmidt ;

Les autres méthodes (Marx, Behring, Röhmer, Debré et Ramon).

# MÉTHODE DE ROUX



## Méthode de Roux

Dès la découverte du sérum antidiphthérique, les auteurs s'intéressent aux propriétés du sérum qui sont corrélatives de son action thérapeutique. Or, à ce point de vue, le sérum possède trois propriétés : 1° Il est préventif ; 2° Il est curatif ; 3° Il est antitoxique. Chacune de ces propriétés peut être mesurée séparément. On adopte, pour cela, des « unités conventionnelles qui ont été fixées par les expérimentateurs comme étant les plus commodes ». (E. Roux, X<sup>e</sup> Cong. Int. Hyg. Démog., Paris, 1900.)

La propriété que présente le sérum antidiphthérique de préserver un animal contre une dose mortelle de microbes ou de toxine, a été une des premières connue et étudiée. On essaya de mesurer ce pouvoir. Cette mesure était simple, mais les divers laboratoires ne pouvaient la pratiquer avec des facteurs toujours identiques. Si l'on utilisait la toxine pour éprouver les cobayes (la toxine est d'activité variable), il était difficile d'injecter des doses de toxine toujours équivalentes. Si l'on se servait de microbes, on utilisait, suivant le laboratoire, un microbe cultivé dans des conditions différentes, dans des milieux différents. Il aurait fallu, pour tous les laboratoires, un microbe cultivé dans des conditions semblables, dans les mê-

mes milieux. Ceci ne pouvant être réalisé, les dosages variaient avec les laboratoires. Pour Roux, cependant, la propriété préventive du sérum antidiphtérique était au moins aussi importante que la propriété antitoxique. « Un sérum peut avoir un pouvoir antitoxique faible et un pouvoir préventif fort. » Roux adopta donc comme notation le pouvoir préventif. Le pouvoir préventif est le rapport entre le poids du cobaye et la quantité de sérum nécessaire pour préserver de la mort un cobaye qui reçoit, douze heures après l'injection de sérum, une injection de  $1/2$  cc. d'une culture fraîche. On dira donc, par exemple, que le pouvoir préventif d'un sérum est de 50.000, lorsque 1 centième de cc. de ce sérum préserve un cobaye de 500 grammes contre une dose de toxine diphtérique tuant en trente-six à quarante heures un cobaye témoin de même poids. Le rapport entre le poids de l'animal (500 grammes) et la quantité de sérum employé (0,01 cc.) mesure le pouvoir préventif du sérum. Le sérum est injecté aux animaux douze heures avant la toxine. Tout cobaye qui, quatre à six jours après l'injection de toxine n'a pas perdu de son poids, est considéré comme préservé.

La comparaison entre les pouvoirs préventif et antitoxique a été faite par L. MARTIN, MOMONT, LOISEAU. Il n'y aurait pas toujours concordance entre les deux pouvoirs, d'après les résultats de leurs tableaux.

# LA MÉTHODE D'EHRlich



## La méthode d'Ehrlich

La méthode de Roux, quoique très logique, avait comme inconvénient de ne point permettre une standardisation des titrages. Rien, en effet, ne permettait de comparer d'un laboratoire à l'autre les sérums préparés, car ni toxine-étalon, ni sérum-étalon n'étaient prévus par Roux en vue de cette comparaison.

C'est à la recherche d'une unité de mesure, conventionnelle, que s'est attaché EHRLICH tout d'abord. Pour avoir une unité-étalon, EHRLICH s'est tout d'abord adressé à la toxine (comme l'avait déjà fait avant lui BEHRING), et il a pensé que si l'on pouvait arriver à obtenir une toxine d'activité constante, celle-ci pourrait être adoptée comme unité de mesure par tous les laboratoires. Il suffirait alors de rechercher, lorsque l'on a un sérum à titrer, quelle est la dose de sérum qui neutralise ou protège contre cette toxine, la dose minima représentant le titre du sérum chiffrable en unités antitoxiques. Mais une telle unité toxique exigeait, pour être exacte, que la toxine conserve intégralement ses propriétés, du moment de sa préparation à cinq ou six mois plus tard. Or, au cours de l'étude à laquelle EHRLICH s'est livré concernant la toxine diphtérique, il a constaté ce fait primordial.

Une toxine conservée à la température du laboratoire perd sa toxicité. Ainsi, si elle tue le cobaye, au départ, c'est-à-dire peu de temps après son élaboration, à 1/500 de cc., cette toxine, conservée, tue après quinze jours à 1/200 de cc. seulement, après un an à 1/10 cc. ou même moins. Il devient dès lors impossible de songer à une toxine-étalon, celle-ci ne devant plus avoir, quelques jours après, la même valeur toxique qu'au moment de sa préparation. Cependant, EHRLICH, dans ses études ultérieures sur la toxine, est arrivé à la constatation suivante : si la toxicité s'atténue, ni le pouvoir qu'a la toxine de vacciner l'animal, ni celui de fixer de l'antitoxine, ne varient. Ainsi, cette même toxine, dont le titre d'activité pathogène a baissé de 1/500 à 1/10 en un an, fixe toujours la même quantité d'antitoxine; autrement dit, il faut la même dose d'antitoxine pour neutraliser 1 cc. de cette toxine, au départ, lorsque dans ce centimètre cube sont présentes 500 doses mortelles, qu'après un an, alors qu'il ne reste plus que 10 doses mortelles dans le centimètre cube en question. De cette constatation, EHRLICH déduisit que les toxines comprennent en réalité deux constituants (nous verrons plus loin qu'il leur en a ajouté un troisième). Un de ces constituants est la toxine proprement dite, dont l'action se révèle par le pouvoir pathogène sur l'animal. Elle est neutralisée par l'antitoxine spécifique. L'autre constituant est le toxoïde, non pathogène, mais susceptible, pour une très large part, de fixer de l'antitoxine, autant et aussi bien que la toxine. En outre, ce toxoïde est immunisant. Il permet de vacciner et d'hyperimmuniser les

chevaux, aussi bien que la toxine fraîche, active et pathogène.

Ce fait présentait, au point de vue du titrage des sérums, un intérêt capital. Si, comme le pensait EHRLICH, on devait choisir pour unifier les méthodes de titrage une unité-standard ou une unité-étalon, il était impossible de s'adresser, pour établir cette unité, à une toxine-étalon car, dans chaque toxine, on ne connaît point la proportion des toxoïdes capables d'absorber l'antitoxine ; et si l'on se fie à la propriété toxique seule, celle-ci est susceptible de trop de variations dans le temps, et d'une atténuation trop rapide pour qu'une unité toxique puisse être conservée, ou adressée à d'autres laboratoires à l'effet de comparaison. Une unité-étalon, si elle devait être établie, devait l'être avec un sérum dont chaque centimètre cube définirait une unité toxique. Il deviendrait possible, alors, de comparer, par rapport à ce sérum, les toxines des différents laboratoires, puis les sérums de ces Instituts. Un titrage précis s'en suivrait. Pour qu'une telle unité fut admise, la condition essentielle qu'elle devait remplir est la conservation, dans le temps, de son titre antitoxique et de sa valeur. Une telle épreuve fut faite par EHRLICH. Le sérum possède des propriétés antitoxiques résistant au vieillissement, plus d'un an, tout au moins, et conservant intégralement leur activité. De là l'institution, par l'Institut de Francfort, d'une unité établie pour 1 cc. d'un sérum dilué en glycérine. Un centimètre cube d'un tel sérum, préparé par EHRLICH, fut appelé par lui « unité antitoxique », unité conventionnelle, mais qui fut acceptée

par tous les laboratoires. L'unité de Francfort a servi depuis à étalonner des sérums dans d'autres Instituts qui préparèrent leur unité; ainsi, l'unité de Washington, qui a exactement la même valeur que celle de Francfort. Dans une enquête récente, le Comité d'experts de la Société des Nations a cherché à se rendre compte, d'ailleurs, si les différentes unités préparées par les laboratoires des différentes Nations avaient une valeur comparable. Les titrages faits par les experts leur ont montré, à ce point de vue, une concordance presque parfaite. L'unité antitoxique utilisée comme étalon par les Instituts de tous les pays a encore aujourd'hui la même valeur comparative qu'à l'époque des recherches d'EHRlich.

### ***Le principe du titrage. La recherche de la dose (Lo)***

Mais il reste à établir le moyen technique qui permettrait de titrer les sérums comparativement à cette unité conventionnelle. Il va de soi que l'on doit chercher, au préalable, quelle dose de toxine il faut ajouter à cette unité pour obtenir un mélange neutre, puis, rechercher avec chacun des sérums à titrer, à réaliser avec cette toxine ainsi préalablement éprouvée, un mélange semblable, un simple calcul permettant ensuite de déduire quelle proportion d'unité antitoxique est présente dans les sérums étudiés. C'est bien là, en effet, le principe même du titrage. Mais comment

l'apprécier exactement? Ou plutôt, faut-il rechercher une neutralisation absolue de la toxine par le sérum, neutralisation telle que dans le mélange accepté il n'y ait ni excès de toxine, ni excès de sérum? C'est bien ce qu'EHRlich a cherché à obtenir. De tels mélanges neutres, dans lesquels toxine et antitoxine se compensent exactement sont les mélanges dits (Lo). Mais la recherche de tels mélanges ne devait pas tarder à mettre EHRlich en présence de phénomènes fort curieux, dont les conséquences ont été grandes en médecine. EHRlich a vu tout d'abord que de tels mélanges (Lo) sont impossibles à obtenir. Si l'on prend en effet une série de tubes dans lesquels on place une dose fixe de toxine, soit 0,1 cc., et que l'on ajoute à chacun des doses variables de sérum, soit 1 unité, 2 unités, 3 unités, 4 unités, etc., puis que l'on injecte ces mélanges à des cobayes, on constate bien que certains mélanges insuffisamment neutralisés tuent le cobaye, d'autres suffisamment neutralisés le laissent survivre; mais si l'on prend les mélanges limites, ceux qui ont la dose de sérum le plus proche de la dose encore inefficace et si l'on cherche à préciser exactement quelle quantité de sérum on doit ajouter pour avoir un mélange neutre rigoureux (Lo), on voit qu'il est impossible d'obtenir une telle précision. La neutralisation s'effectue suivant une gamme très étendue de dilutions de sérum; et, dans la série des mélanges, entre ceux qui ont un excès de sérum, il y a une marge très large.

### ***Le phénomène d'Ehrlich***

Mais ce n'est pas à cela que s'est borné la constatation d'EHRlich. L'étude de ces mélanges (Lo) l'a mis en présence du phénomène dit « phénomène d'Ehrlich », fortement discuté depuis, et diversement interprété par les auteurs. Nous nous en tiendrons ici aux faits, à l'interprétation d'EHRlich lui-même et à son application pour le titrage.

Si l'on prend, dans une série de mélanges analogues aux précédents, celui qui donne la dose (Lo) la plus vraisemblable, c'est-à-dire le mélange laissant survivre le cobaye, et qui, dans la série des dilutions toxine-antitoxine où le sérum est en dose croissante, vient immédiatement après le mélange toxine-antitoxine qui a entraîné la mort des cobayes, on constate le fait suivant : Un tel mélange, qui, cependant, ne saurait a priori contenir d'excès de sérum, est capable de neutraliser encore un surplus de toxine, si on en ajoute une seconde fois en excès dans les tubes. Et cet excès de toxine susceptible d'être encore neutralisé par un mélange neutre est assez élevé parfois. C'est là le phénomène d'Ehrlich. Une telle constatation a eu trois conséquences :

a) Une conséquence doctrinale : EHRlich, cherchant à expliquer ce phénomène, a abouti à la conception des toxines, fort critiquée depuis, mais qui est la suivante :

Une toxine n'est pas un corps simple. A côté de la toxine, pathogène, il y a les toxoïdes, immunisants,

et un troisième ordre de composants, les toxones, composants ni pathogènes, ni immunisants, mais susceptibles, pour leur part, de fixer encore de l'antitoxine. L'antitoxine ajoutée à une toxine ainsi constituée se répartit sur ces trois composants. La toxine proprement dite est bien neutralisée et ne tue plus l'animal. Mais l'effet sur les deux autres composants est appréciable par le phénomène d'Ehrlich : la fixation d'une partie de l'antitoxine sur les toxoïdes se traduit par une certaine neutralisation de ceux-ci, puisque de tels mélanges sont très peu vaccinants, confèrent une immunité active très réduite. Les combinaisons toxine-antitoxine et toxoïde-antitoxine paraissent assez stables, irréversibles ou peu réversibles, car de très vieilles toxines, réduites et ramenées à des toxoïdes, sont neutralisées au même taux de sérum que les toxines fraîches.

Il n'en est pas de même des toxones, qui contractent avec l'antitoxine des combinaisons réversibles, et c'est à la part d'antitoxine combinée aux toxones qu'il faut attribuer le phénomène d'Ehrlich. Un excès de toxine vient-il, en effet, à être ajouté? (Un excès de toxoïde également, quoique cela soit plus difficile à juger), la complexe toxone-antitoxine se détruit, et l'antitoxine libérée va se fixer sur la toxine ajoutée en excès. Ainsi s'explique le fait qu'un excès de toxine, ajouté à un mélange neutre (Lo), soit encore neutralisé.

Les toxones ont été fort discutées. En général, elles ne sont plus admises. Cependant, dans des expériences récentes, MM. LEULIER, SÉDALIAN et Mme CLAVEL

n'ont pas eu d'autre moyen que de les faire intervenir pour expliquer le fait constaté par eux qu'une toxine précipitée fixe beaucoup plus d'antitoxine si elle est diluée dans un bouillon peptoné ou de la gélatine, que si elle est diluée dans de l'eau physiologique ou de l'eau distillée.

b) La seconde conséquence du phénomène d'Ehrlich, quoique s'écartant de notre sujet, mérite d'être rappelée ici : EHRLICH était chimiste et raisonnait en chimiste. La notion établie par lui d'antidotes, comme l'antitoxine, se fixant sur des corps organiques inertes, comme les toxones, pour former avec eux des complexes réversibles susceptibles d'être déplacés par un excès de poison, l'a amené à rechercher les corps chimiques, organiques ou minéraux susceptibles, lorsqu'ils sont introduits dans l'organisme, de contracter avec les albumines tissulaires, des combinaisons indifférentes, inoffensives, mais réversibles. De telles combinaisons pourraient être déplacées par la présence, dans ces organismes, de virus ou de poisons ayant pour les corps chimiques en question une affinité plus grande que les albumines tissulaires. De ce déplacement pourrait peut-être résulter une neutralisation de ces virus ou de ces toxines. Cette hypothèse hardie, ce raisonnement, vrai ou faux, ont conduit EHRLICH à la découverte de la chimiothérapie de la syphilis.

c) La conséquence la plus intéressante pour nous a été la méthode de titrage que nous étudions. L'impossibilité d'établir une dose (Lo) qui soit exacte, a amené EHRLICH à rechercher la dose mortelle qui sert à titrer le sérum en pratique.

### ***La dose limite mortelle ( $L_+$ )***

EHRLICH a pensé que l'on pouvait rechercher un mélange toxine-antitoxine tel que tout ce que les toxones sont susceptibles d'immobiliser d'antitoxine, le soit, la toxine ayant été elle-même neutralisée en partie. Pour obtenir un tel mélange, il fallait qu'il reste encore de la toxine en excès. Supposons, en effet, un mélange toxine-antitoxine qui ne laisse pas survivre le cobaye, mais qui ne le tue qu'après trois, quatre, cinq jours d'incubation. On pourra dire d'un tel mélange, que la plus grande partie de toxine active pathogène a été neutralisée, car, en effet, la mort est entraînée par une toxine normalement active, non atténuée, au bout de vingt-quatre heures. Et, cependant, dans ce mélange relativement neutralisé, la toxine a pris, dans l'antitoxine qui lui était présentée, tout ce qu'elle pouvait prendre. Et s'il y a de l'antitoxine fixée sur des toxones, c'est sous la forme d'un composé irréversible dont la toxine proprement dite ne peut absolument pas faire profit. EHRLICH a recherché de tels mélanges susceptibles de tuer le cobaye après une incubation très retardée, en prenant comme test la mort du cobaye en trois jours (toutes choses étant égales du côté du poids des cobayes, 250 grammes), l'expérience lui ayant montré que la recherche de cette mort en trois jours était plus facile à apprécier et mieux adaptée aux conditions pratiques de l'expérience. Un mélange toxine-antitoxine diphtérique qui tue le cobaye en trois jours est dit « dose

limite mortelle » et porte l'indication (L+). De tels mélanges sont en effet très précis, contrairement aux mélanges (Lo). Si on leur ajoute un excédent de toxine, cet excédent de toxine manifeste sur l'animal ses pleins effets et tue celui-ci en proportion de la dose de toxine qui a été ajoutée. Il n'y a donc point ni excès d'antitoxine, ni antitoxine fixée sur les toxones en combinaison réversible. Si on cherche à réaliser de tels mélanges avec une toxine qui vient d'être préparée, tuant le cobaye à 1/500 cc., et cette même toxine alors qu'elle a vieilli, ne tue plus qu'au 1/10 de cc., par exemple, et ne renferme pour ainsi dire que des toxoïdes, ce sont les mêmes doses d'antitoxine qu'il faut ajouter pour obtenir le mélange (L+). On peut donc se servir de toxine ancienne, peu active pour l'animal. Il y aura toujours, dans ces produits vieillis, un excès suffisant de toxine pour que l'animal soit tué en trois jours.

### *Le titrage en pratique*

En possession de ces données, l'on effectue le titrage par la méthode d'Ehrlich, de la façon suivante :

Dans un premier temps, on recherche, à l'aide de l'unité antitoxique d'Ehrlich, quelle dose de toxine il faut ajouter à une unité antitoxique pour obtenir un mélange L+. Ainsi, par exemple, on met dans une série de tubes, une unité antitoxique, et on ajoute

dans chacun de ces tubes des doses variables de la toxine à étudier :

Dans le 1<sup>er</sup> tube : 0,1 cc. de toxine + 1 U. A.

Dans le 2<sup>e</sup> tube : 0,2 cc. de toxine + 1 U. A.

Dans le 3<sup>e</sup> tube : 0,3 cc. de toxine + 1 U. A.

etc...

Après une demi-heure de contact, on injecte ces mélanges aux cobayes, et le cobaye qui meurt en trois jours est celui qui indique la dose de toxine à ajouter à une unité antitoxique pour avoir un mélange L+.

Dans une seconde série d'expériences, on met en contact cette dose de toxine L+ avec des dilutions différentes de sérum à titrer. Ainsi, par exemple :

Dans un 1<sup>er</sup> tube : (L+) toxine + 1/500 cc. de sérum

Dans un 2<sup>e</sup> tube : (L+) toxine + 1/400 cc. de sérum

Dans un 3<sup>e</sup> tube : (L+) toxine + 1/300 cc. de sérum

etc...

et l'on recherche, après injections aux cobayes, quel est le cobaye qui meurt en trois jours. Ce cobaye a reçu une dilution de sérum égale à une unité antitoxique. Il suffit donc, par un simple calcul, d'établir combien il y avait d'unités antitoxiques dans chaque centimètre cube de sérum.

Le titrage d'Ehrlich a été l'objet de critiques, mais il a été accepté par tous. On a accusé les cobayes de présenter des variations. En réalité, ces variations sont minimales. Le plus gros reproche que l'on puisse lui faire, c'est d'exiger un grand nombre d'animaux, mais ce reproche tombe, si l'on songe à l'importance du titrage exact d'un produit thérapeutique comme le

sérum antidiphtérique. Le titrage d'Ehrlich a comme avantage d'être rigoureux. Aucune objection scientifique ne lui peut être présentée. Au cours des différentes enquêtes entreprises par la Société des Nations pour la standardisation des sérums, c'est toujours à la méthode d'Ehrlich que l'on est revenu.

Voici d'ailleurs les recherches faites à ce sujet :

---

*Comparaison des unités allemande et américaine*  
par Th. MADSEN

(D'après les expériences du Dr L.-E. WALBUM.)

Cette comparaison a été faite de la manière suivante : les deux sérums-étalons (de Francfort et de Washington) ont été titrés avec la toxine étalon provenant du « Statens Seruminstitut » (de Copenhague) et avec la toxine étalon de Francfort. Le but était de déterminer le L+ des deux toxines au moyen de ces deux sérums. Les mélanges d'une U. A. et de la quantité de toxine indiquée ont toujours été faits de telle sorte que le volume total fut 4 cc. Ces mélanges furent injectés à des cobayes de 250 gr. par voie sous-cutanée, après une heure de réaction à la température du laboratoire. Les animaux furent observés pendant quatre jours.

*Toxine étalon danoise + sérum étalon de Francfort et de Washington*

Sérum de Francfort (reçu le 2 mars 1922)

|             | Toxine<br>cc. | Poids des<br>cobayes<br>gr. | 2 <sup>e</sup> jour<br>gr. | 3 <sup>e</sup> jour<br>gr. | 4 <sup>e</sup> jour<br>gr. | L + = |
|-------------|---------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------|
| 2/III 1922  | 0,80          | 230                         | 220 inf.                   | 210 inf.                   | 200 malade                 | 0,82  |
|             | 0,82          | 230                         | 210 »                      | + 2 1/2                    |                            |       |
|             | 0,86          | 230                         | 220 »                      | + 2 1/2                    |                            |       |
| 6/III 1922  | 0,78          | 240                         | 220 inf.                   | 210 inf.                   | 200 inf.                   | 0,80  |
|             | 0,80          | 255                         | 240 »                      | 240 »                      | 210 » + 4                  |       |
|             | 0,82          | 255                         | 230 »                      | 210 inf. + 3               |                            |       |
| 22/III 1922 | 0,78          | 245                         | 230 inf.                   | 230 inf.                   | 215 inf.                   | 0,82  |
|             | 0,80          | 255                         | 225 »                      | 210 »                      | 190 malade                 |       |
|             | 0,82          | 245                         | 220 »                      | 210 »                      | 200 inf. + 2 1/2           |       |
|             | 0,84          | 245                         | 215 »                      | 210 » + 3 1/2              |                            |       |
|             | 0,78          | 240                         | 240 inf.                   | 230 inf.                   | 240 inf.                   | 0,82  |
| 27/III 1922 | 0,80          | 260                         | 240 »                      | 235 »                      | 235 »                      |       |
|             | 0,82          | 250                         | 210 » + 2                  |                            |                            |       |
|             | 0,86          | 240                         | 215 »                      | + 2 1/2                    |                            |       |

Sérum de Washington (reçu le 2 mars 1922)

|             |      |     |           |            |          |        |
|-------------|------|-----|-----------|------------|----------|--------|
| 2/III 1922  | 0,80 | 230 | 230 inf.  |            | 225 inf. | 0,82   |
|             | 0,82 | 230 | 210 » + 2 |            |          |        |
|             | 0,84 | 230 | 210 »     | + 2 1/2    |          |        |
|             | 0,86 | 260 | 260 »     | + 2 1/2    |          |        |
| 6/III 1922  | 0,78 | 250 | 250 inf.  | 250 inf.   | 250 inf. | 0,80   |
|             | 0,80 | 255 | 230 »     | 215 »      | + 3 1/2  | 0,80   |
|             | 0,82 | 255 | 235 »     | + 2 1/2    |          |        |
| 22/III 1922 | 0,59 | 270 | 230 inf.  |            |          | < 0,59 |
|             | 0,61 | 245 | 205 »     | + 2 1/2    | + 3 1/2  |        |
|             | 0,63 | 260 | 230 »     | 190 malade |          |        |
|             | 0,65 |     |           | + 2 1/2    |          |        |
|             |      |     |           | + 1 1/2    |          |        |

Sérum de Francfort (le même que ci-dessus)

# Sérum de Francfort (suite)

| Toxine cc.  | Poids des cobayes gr. | 2 <sup>e</sup> jour gr. | 3 <sup>e</sup> jour gr. | 4 <sup>e</sup> jour gr.            | L + = |
|-------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------------|-------|
| 27/III 1922 | 0,55                  | 225 inf.                | 200 inf.                | 185 inf.                           | 0,57  |
|             | 0,57                  | 240 »                   | 220 »                   | + 3 1/2                            |       |
|             | 0,59                  | 240 »                   | + 2                     |                                    |       |
|             | 0,61                  | 240 »                   | + 2 1/2                 |                                    |       |
| 8/IV 1922   | 0,55                  | 250 inf.                | 250 inf.                | 240 inf.                           | 0,57  |
|             | 0,55                  | 245 »                   | 250 inf.                | 260 » vit le 10 <sup>e</sup> jour. |       |
|             | 0,56                  | 240 »                   | 250 »                   | 240 »                              |       |
|             | 0,56                  | 225 »                   | 240 »                   | 250 » vit le 10 <sup>e</sup> jour. |       |
|             | 0,57                  | 220 »                   | 205 »                   | + 3 1/2                            |       |
|             | 0,57                  | 220 »                   | 210 »                   | 190 malade + 10 <sup>e</sup> jour. |       |
|             | 0,58                  | 250 »                   | 215 »                   | + 3 1/2                            | 0,58  |
|             | 0,58                  | 225 »                   | 190 »                   | + 3 1/2                            |       |

## Sérum de Washington (reçu le 2 mars 1922)

|             |      |       |          |          |                                       |        |
|-------------|------|-------|----------|----------|---------------------------------------|--------|
| 22/III 1922 | 0,59 | 265   | 235 inf. | 215 inf. | + 3 1/2                               | < 0,59 |
|             | 0,61 | 265   | 225 »    | + 2 1/2  |                                       |        |
|             | 0,63 | 260   | 220 »    | + 2 1/2  |                                       |        |
|             | 0,65 | 245   | 195 »    | + 2 1/2  |                                       |        |
| 27/III 1922 | 0,55 | 260   | 250 inf. | 240 inf. | 240 inf.                              | 0,57   |
|             | 0,57 | 240 » | 190 »    | + 2 1/2  |                                       |        |
|             | 0,59 | 260   | 240 »    | 240 inf. | + 3 1/2                               |        |
|             | 0,61 | 240   | 210 »    | + 3      |                                       |        |
| 27/III 1922 | 0,55 | 245   | 220 inf. | + 2 1/2  | Douteuse                              |        |
|             | 0,55 | 240   | 220 »    | 210 inf. | + 3 1/2                               |        |
|             | 0,56 | 240   | 220 »    | 210 »    | + 3 1/2                               |        |
|             | 0,56 | 240   | 220 »    | 200 »    | 180 inf. vit le 10 <sup>e</sup> jour. |        |
|             | 0,57 | 240   | 210 »    | 205 »    | 190 inf.                              |        |
|             | 0,57 | 250   | 215 »    | 200 »    | + 4                                   |        |
|             | 0,58 | 240   | 230 »    | 210 »    | + 3 1/2                               |        |
|             | 0,58 | 260   | 235 »    | 220 »    | 225 inf. vit le 10 <sup>e</sup> jour. |        |

Il résulte de ces épreuves que L+ est absolument identique pour les deux toxines étalons examinées, tant par l'unité allemande que par l'américaine ; ces

# LA MÉTHODE DE RAMON



## La méthode de Ramon

### *Le phénomène de floculation*

#### HISTORIQUE

C'est à Rudolph KRAUS que revient le mérite d'avoir, le premier, montré qu'en général l'union entre la toxine et l'antitoxine pouvait probablement être liée à un changement d'état colloïdal, et visible. En 1907 déjà, KRAUS avait vu que les filtrats de cultures cholériques et typhiques additionnés en proportion convenable de l'antisérum correspondant donnaient des précipités nets (« vigoureux »). Cette méthode put être perfectionnée par la suite, de façon à fournir un diagnostic extraordinairement précieux pour d'autres buts. On fut ainsi amené à employer cette méthode si maniable pour les deux toxines les plus importantes en pratique. Cependant, KRAUS, malgré de nombreux essais, n'observa que des résultats négatifs, ce qui lui fit conclure que, ou bien ces toxines ne contenaient pas de substance précipitable, ou bien les antitoxines ne renfermaient pas de précipitine. KRAUS voyait dans ce fait un caractère différentiel fondamental permet-

tant de distinguer les sérums antitoxiques et anti-infectieux.

Par la suite, SCHWONER put montrer qu'on pouvait obtenir avec de jeunes cultures diphtériques contenant peu de toxines, des sérums donnant des précipités dans les extraits au sel marin, mais non dans les filtrats de cultures en bouillon.

WASSERMANN a décrit des faits semblables à propos d'extraits préparés avec de la diéthylamine, à partir de bacilles diphtériques. Mais les précipitations n'étaient obtenues qu'avec des sérums eux-mêmes préparés par immunisation avec de tels extraits, et non avec des sérums antitoxiques.

Les conceptions basées sur ces constatations ont dû être modifiées durant ces dernières années, après qu'on eut montré que certaines toxines additionnées de leur antitoxine donnaient néanmoins des précipités, et surtout après que CALMETTE et MASSOL eurent utilisé le phénomène de la précipitation du venin de cobra par le sérum antivenimeux pour effectuer « in vitro » un titrage approximatif de ce dernier.

Plus récemment, NICOLLE, DEBAINS et CÉSARI ont réussi, en employant une technique spéciale, à appliquer la même réaction au dosage des antitoxines diphtérique et tétanique. Cette technique repose sur la formation d'un disque opalescent au-dessus de la limite de superposition d'un culot de toxine concentrée et solidifiée par la gélatine, et d'une dilution de sérum à titrer.

GEORGI, en particulier, put montrer qu'après addition d'extraits de cœur cholestérinisés et convenable-

ment dilués, la toxine diphtérique pouvait aussi donner lieu à des floculations spécifiques avec le sérum antitoxique. Mais, d'après GEORGI, l'addition d'extraits d'organes et la cholestérinisation sont les conditions de la floculation. Il est intéressant de constater qu'il observe que la floculation est liée à un optimum strict, si bien qu'un excès de sérum inhibe la floculation. C'est sans doute ce fait qui explique que KRAUS ne l'ait pas obtenue. Comme GEORGI ne put pas trouver de parallélisme étroit entre l'action antitoxique et la floculation, il estima ne pas pouvoir utiliser la réaction de floculation pour la mesure du contenu antitoxique, à laquelle il avait sans doute songé.

C'est à RAMON que l'on doit d'avoir montré sans conteste que des toxines bactériennes, telles que les toxines diphtérique et tétanique donnent des précipitations spécifiques soumises à des lois, avec des quantités « optimales » de leur sérum antitoxique.

### ***La floculation dans les mélanges toxine-sérum antidiphtérique***

#### SA SIGNIFICATION

Au cours de ses travaux sur les complexes toxine-antitoxine, RAMON se rendit compte que « la précipitation pouvait se manifester dans les mélanges toxine-sérum antidiphtérique sous la forme habituelle, et qu'il était alors possible de mettre en œuvre un pro-

cédé de titrage « in vitro » basé sur l'apparition, dans certaines conditions, d'un précipité par mélange direct de la toxine et du sérum ».

Si l'on observe, en effet, une série de tubes à essai contenant chacun 20 cc. de toxine diphtérique filtrée au neuvième jour de culture, et tuant en quatre jours un cobaye de 250 grammes à la dose de 1/500 cc., auxquels on a ajouté des quantités décroissantes (2 cc.-0,25 cc. par exemple) d'un sérum antidiphtérique frais titrant 200 unités-Ehrlich au cc., on constate bientôt que le liquide de plusieurs de ces tubes devient de plus en plus opalescent pour se transformer (au bout d'un temps variable) en floculation par l'agglomération des fines particules en flocons de plus en plus nets. Cette floculation, rigoureusement spécifique, n'apparaît pas lorsque les conditions du mélange sont changées, soit qu'on ajoute à la toxine du sérum normal ou tout autre antisérum, soit qu'on ajoute au sérum antidiphtérique toute autre toxine que la toxine diphtérique ou même de la toxine diphtérique dont les propriétés toxiques ont été détruites par la chaleur. La floculation apparaît à des moments différents dans chacun des tubes, mais la floculation initiale a une signification particulière au point de vue des proportions de toxine et d'antitoxine présentes dans le mélange. Un tel mélange, injecté au cobaye à des doses de 1 ou plusieurs cc. ne provoque ni lésions locales, ni phénomènes d'intoxication précoces ou tardifs. Ce mélange est, en outre, incapable de protéger l'animal injecté contre l'action nocive d'une nouvelle quantité de toxine (en tenant compte du phénomène d'Ehrlich

dit RAMON). Les mélanges ayant donné des floculations plus lentes, contenant des doses soit immédiatement inférieures, soit immédiatement supérieures sont, les premiers de plus en plus toxiques, les seconds de plus en plus antitoxiques sur le cobaye. Dans le mélange ayant floculé le premier (inoffensif pour le cobaye), il y a neutralisation; ou mieux saturation réciproque aussi parfaite que possible des deux constituants.

« Ainsi donc, dans le mélange qui a floculé en premier lieu, la toxine a été exactement neutralisée par la dose de sérum ajoutée. D'après cela, la même quantité de sérums d'origine différente, mais d'égale valeur antitoxique, doit faire apparaître le même précipité dans le même volume d'une même toxine. C'est ce que l'expérience vérifie en effet. De plus, en pratiquant des mélanges avec des sérums de titres variés, on se rend compte (ce qui est d'ailleurs logique après ce que l'on vient de voir) que la dose de sérum nécessaire à la formation du précipité est inversement proportionnelle à la teneur du sérum en antitoxine et que si un sérum de titre donné détermine un précipité à la dose de X cc., pour un autre sérum de valeur double ce précipité apparaîtra avec  $\frac{X}{2}$  cc. de ce sérum. »

On peut donc, connaissant la quantité d'antitoxine que la toxine peut saturer, mesurer le pouvoir antitoxique d'un sérum quelconque en établissant une série de mélanges à quantités fixes de toxine, à quantités variables d'antitoxine, et en recherchant le mélange dans lequel apparaît la floculation initiale. Le

volume du sérum qui provoque cette floculation étant connu, on saura combien ce volume renferme d'antitoxine, d'où la valeur antitoxique cherchée : cette valeur étant inversement proportionnelle au volume du sérum capable de faire apparaître la floculation initiale. Il faut, cependant, déterminer au préalable le pouvoir floculant d'une toxine que l'on destine au dosage du pouvoir antitoxique de sérums antidiphtériques, au moyen d'un sérum étalonné d'après une unité de mesure.

***Le dosage du sérum antidiphtérique  
par la floculation***

**MÉTHODE DE RAMON**

Ainsi, d'après RAMON, la quantité de sérum capable de donner avec une quantité donnée de toxine la floculation la plus rapide, correspond à la dose exactement neutralisante, et permet ainsi de calculer la valeur antitoxique du sérum. C'est sur ce fait qu'est basée sa méthode de titrage du sérum antidiphtérique. Dans un premier temps, on dose la toxine par rapport à un sérum-étalon. Dans un second temps a lieu le titrage des sérums à étudier par rapport à la toxine, dosée au préalable.

### *1° Détermination du pouvoir saturant de la toxine destinée aux dosages*

Dans un certain nombre de tubes à essai contenant tous un volume déterminé (20 cc.) de la toxine choisie en vue des dosages à effectuer, on ajoute des quantités progressivement décroissantes du sérum-étalon (de 2 cc. à 0,25 cc. par exemple). On agite et on renverse plusieurs fois les tubes de façon à parfaire le mélange. On laisse ensuite au repos à la température ambiante et on observe attentivement l'apparition de la floculation initiale (précipité indicateur). Supposons que le sérum-étalon titre par exemple 300 unités-Ehrlich au centimètre cube, et que la floculation apparaisse dans le mélange contenant 0,6 cc. de sérum; il faudra donc, pour saturer 20 cc. de toxine,  $300 \times 0,6 = 180$  unités. Par conséquent, un sérum qui floculerait en présence de la même quantité de toxine à la dose de 1 cc. titrerait donc 180 unités au centimètre cube.

Si la floculation initiale apparaît avec une dose moindre de sérum, cela signifie que la richesse de ce sérum en antitoxine est plus grande; le contraire signifiera une moins grande valeur antitoxique du sérum. Un calcul permet d'établir le titre au centimètre cube.

On peut ainsi, par le calcul des valeurs correspondant à chaque dose de sérum, établir une table de titrage.

Ayant dosé la toxine à utiliser par rapport au sérum-étalon donné, il est maintenant possible de doser un sérum antidiphthérique quelconque.

## *2° Dosage d'un sérum antidiphtérique*

Si l'on a affaire à un sérum sur lequel on a déjà des indications (dosage antérieur), on se borne simplement à faire quelques mélanges avec des doses de sérum très voisines. Dans le cas contraire, on procédera suivant la technique indiquée pour la détermination du pouvoir saturant de la toxine, en remplaçant dans les mélanges le sérum-étalon par le sérum à étudier. On observe le mélange donnant la floculation initiale. Un simple calcul donne le titre.

On peut, pour plus de précision, recommencer le titrage avec des quantités de sérum légèrement supérieures ou légèrement inférieures à celle ayant donné le précipité indicateur. On note dans ce cas le mélange dans lequel apparaît la floculation initiale.

D'après RAMON, « les résultats de très nombreux titrages pratiqués selon cette technique, et qui sont, dans la plupart des cas, parallèles à ceux obtenus « in vivo » (la répétition « in vitro » et « in vivo » des dosages dans les cas divergents a toujours été en faveur de la précipitation) permettent de se rendre compte de la précision de la méthode ».

La formation du précipité, dans la rencontre de la toxine diphtérique et de l'antitoxine, est, naturellement, liée à certaines conditions :

### *Influence de la température*

Pour un même sérum, la floculation apparaît lentement à la température ordinaire, et cette apparition est d'autant plus rapide que la température s'élève

progressivement jusqu'à 55°-56°. Il est cependant préférable d'opérer à la température ambiante, car, dans ce cas, les précipités apparaissent à des intervalles de temps plus éloignés. D'où plus de facilité dans l'interprétation.

Au-dessus de cette température, jusqu'à 65°, la floculation s'effectue d'autant plus lentement que la température s'élève, et le précipité indicateur apparaît dans le mélange contenant une quantité de sérum inférieure à celle qui, normalement, doit entraîner la floculation initiale. Si la température s'élève encore, la floculation n'a plus aucune signification.

Si l'on a, au préalable, chauffé séparément les deux constituants du mélange, les conditions de la floculation sont différentes : La toxine, chauffée à 45° pendant une demi-heure, se comporte comme la toxine non chauffée. A 50°, le précipité, retardé, se produit avec une quantité moindre de sérum et on n'obtient plus de précipité si la toxine a subi pendant une demi-heure une température de 58°-60°, le pouvoir toxique ayant presque disparu.

Quant au sérum, s'il a été chauffé jusqu'à 56°, il n'en résulte qu'un retard dans l'apparition du précipité indicateur. Si l'on a atteint 60° pendant trois minutes, le sérum a perdu la propriété de flocculer avec la toxine.

### *Influence de la toxine*

Au point de vue du dosage du sérum antidiphthérique, il n'est pas besoin de recourir à l'emploi d'une toxine particulière. Une toxine « forte » n'est pas indispen-

sable : Il y a seulement avantage à utiliser une bonne toxine, car la floculation est plus rapide, et on évite ainsi les dilutions de sérums à titrer. Bien qu'une assez grande quantité (20 cc.) de toxine soit nécessaire pour obtenir une réaction nette, on peut (si l'on ne dispose que d'une faible quantité de toxine), n'employer pour les mélanges que 10 cc. ou même 5 cc.

### *Influence du sérum*

Le temps d'apparition de la floculation est constant pour un même sérum; mais si l'on considère un certain nombre de sérums frais titrant le même nombre d'unités-Ehrlich au centimètre cube, le précipité indicateur apparaîtra à des moments différents pour chacun des sérums (de 15' à 36 heures). Les sérums d'animaux récemment immunisés donneraient en général une floculation plus rapide. « Ces différences dans les temps d'apparition de la floculation initiale, lorsqu'il s'agit, bien entendu, de sérums frais n'ayant subi aucun traitement, correspondent-elles simplement à des variations de composition chimique ou d'état physique de ces sérums, sans signification aucune? Il est possible que la vitesse de floculation ait une signification particulière au point de vue de l'immunité. Il est possible que cette vitesse de floculation soit la manifestation d'une des propriétés que Roux signalait déjà au Congrès de Paris, en 1900, et que n'apprécie pas la mesure du titre antitoxique d'Ehrlich, propriété que de nombreux auteurs ont cherché à dépister et à évaluer, en particulier KRAUS et ses collaborateurs dans

leurs travaux sur les « avidités » spéciales des antitoxines pour la toxine. La valeur réelle de l'antitoxine serait en somme représentée par la somme des deux valeurs : l'une quantitative correspondant au taux de la floculation (et par conséquent au pouvoir antitoxique exprimé en unités d'Ehrlich); l'autre qualitative, indiquée par la vitesse de floculation ».

Le pouvoir toxique de la toxine peut lui-même être dosé par floculation (Ramon). On détermine, en premier lieu, la quantité de doses mortelles en présence de laquelle l'antitoxine qui doit servir aux dosages du pouvoir toxique est capable de faire apparaître la floculation. La technique est la même que pour le dosage de l'antitoxine (série de tubes contenant 20 cc. de toxine et des doses variables du sérum antidiphtérique choisi en vue des titrages futurs). On note l'apparition du précipité indicateur. Si la toxine tue le cobaye de 250 gr. à la dose de 1/600 cc., et si cette floculation apparaît dans le tube contenant 20 cc. et 0,7 de sérum, on dit que ces 0,7 cc. neutralisent  $600 \times 20 = 12,000$  doses mortelles. Un centimètre cube du même sérum ferait apparaître la floculation en présence de  $\frac{12.000 \times 10}{0,7} = 17.000$  doses mortelles. Le pouvoir

toxique de la toxine est de :  $\frac{17.000}{20} = 850$  doses mortelles.

On dresse, grâce au calcul, une table, qui ne vaut évidemment que pour un sérum donné. On comprend qu'en possession d'une telle table, il soit possible de doser le pouvoir toxique d'une toxine quelconque, en utilisant la méthode de floculation avec le sérum utilisé déjà.

Glenny a eu l'idée de titrer le pouvoir floculant de diverses toxines avec un même sérum et a proposé de représenter ce pouvoir par la notation  $\text{Lf}$ .

Ramon apprécie la valeur de l'anatoxine en unités immunisantes, par une technique analogue.

***Propriété flocculante de la toxine et de l'antitoxine  
diphthériques dans la réaction de Ramon***

Les expériences de RAMON ont démontré que la toxine intervient « activement » dans la floculation et qu'elle manifeste vis-à-vis de l'antitoxine un véritable pouvoir flocculant, pouvoir que l'on peut facilement titrer par une technique analogue à celle mise en œuvre pour le dosage du sérum antidiphthérique. RAMON s'est alors demandé s'il ne serait pas possible qu'il existât une relation entre le pouvoir flocculant et le pouvoir toxique, et, pour étudier ces propriétés, a soumis la toxine à des influences diverses. Ses recherches lui ont permis d'aboutir aux conclusions suivantes : jusqu'au huitième jour, dans le bouillon de culture, le pouvoir flocculant et le pouvoir toxique subissent l'un et l'autre un accroissement progressif, leurs courbes sont exactement superposables, et l'un peut servir à titrer l'autre. A partir du neuvième jour, le pouvoir toxique baisse progressivement, le pouvoir flocculant restant stationnaire pendant assez longtemps. Si, à ce moment-là, on prélève des échantillons de toxine et qu'on les soumette à divers traitements, on constate que la toxicité diminue lentement en glacière, moins lentement à la température ambiante, rapidement à l'étuve. Quant au pouvoir flocculant, il n'a pas varié et la toxine a besoin, pour donner une floculation, de la quantité d'antitoxine qui la saturait au neuvième jour. Seule, la vitesse de réaction aurait

diminué. Il y a donc concordance entre les deux pouvoirs, pendant toute la durée de l'élaboration de la toxine en bouillon de culture, et pendant cette période, le pouvoir flocculant peut servir à titrer le pouvoir toxique (avec une précision au moins égale, sinon supérieure au titrage « in vivo »). Par la suite, la flocculation n'indiquera plus le pouvoir toxique actuel, mais le pouvoir toxique maximum qui a été atteint par la toxine au cours de la culture. Le pouvoir flocculant est donc très stable, le pouvoir toxique étant particulièrement instable. Une toxine diphtérique pourra donc, sous des influences diverses, perdre plus ou moins son pouvoir nocif, et conserver intégralement son pouvoir flocculant vis-à-vis de l'antitoxine. Au point de vue pratique, d'ailleurs, ce dernier fait acquiert une importance secondaire puisque « ce n'est pas la toxicité « actuelle » qui importe, mais la teneur en « matière neutralisante » vis-à-vis de l'antitoxine (appelée pouvoir antigène intrinsèque par RAMON) » (J.-R. MÖRCH).

Déjà dans ses premières notes sur la réaction de flocculation (1922), G. RAMON attire l'attention sur le fait que certains sérums d'égal pouvoir antitoxique, mais d'origines diverses, donnent le même précipité dans le même mélange, mais dans des intervalles de temps plus ou moins grands. « Il y a lieu de se demander, à ce propos, si ces différences des temps d'apparition des précipités sont dues uniquement à des variations de composition chimique ou d'état physique des sérums sans rapport avec les phénomènes de l'immunité, ou bien si elles ne correspondent pas plutôt à des différen-

ces d'affinité spécifique des sérums pour la toxine ». On reconnut également bientôt (S. SCHMIDT, 1923) que la force de la toxine jouait un rôle prépondérant en ce qui concerne la vitesse de floculation, de telle sorte que la valeur de Kf. (temps de floculation) diminue progressivement avec la puissance de la toxine employée. Certains auteurs admettent (S. SCHMIDT, RAMON, GLENNY et ses collaborateurs, etc.) que la « valeur antigène intrinsèque » détermine la vitesse du processus de floculation, et que la vitesse très variable avec laquelle floclent les divers immun-sérums vis-à-vis de la même toxine est due à des particularités, des différences qualitatives du sang des producteurs d'antitoxine.

SCHMIDT et MÖRCH ont essayé d'établir une relation entre la vitesse du processus de floculation et le pouvoir antigène de la toxine, et sont arrivés à une formule mathématique (la valeur de Kf. fut approximativement trouvée inversement proportionnelle à la valeur antigène de la toxine) (1).

Pour J.-R. MÖRCH et S. SCHMIDT, le facteur qui détermine la vitesse de la réaction de floculation, se trouve dans l'immun-sérum. Si l'on fait un mélange, à parties égales, de deux sérums, l'un faible et l'autre fort, on obtient un mélange à peu près analogue à celui qui résulterait d'une opération semblable dans laquelle on utiliserait deux parties égales de sérum fort et de sérum de cheval neuf, puisque le sérum

(1) Kf.  $a=k$ . — Kf = temps de floculation. —  $a$ =valeur antigène intrinsèque. —  $k$ =constante variant pour les divers sérums.

faible contient si peu d'antitoxine que l'on peut en faire abstraction. Si l'on veut obtenir la neutralisation d'une quantité fixe de toxine, il faudra donc employer une quantité double du sérum ainsi dilué. Le mélange neutre « toxine-antitoxine » contient, dans ce cas, la même quantité du principe flocculant qu'un mélange neutre « toxine-sérum fort », seul. La valeur de Kf. est la même dans les deux cas (expérience de SCHMIDT et MÖRCH). Si le temps de flocculation relevait des propriétés de la toxine, seule importerait la proportion des deux sérums dans le mélange, et ce dernier aurait montré une valeur de Kf. bien supérieure. Les recherches auxquelles ils se sont livrés, ont confirmé les hypothèses de SCHMIDT et MÖRCH à ce sujet.

RENAUX a ensuite recherché les conditions dans lesquelles se produit la flocculation dans des mélanges de toxine et de sérums antidiphthériques à affinités différentes pour la toxine, et est arrivé aux conclusions suivantes : S'il existe une très grande différence d'affinité des sérums pour la toxine, la méthode de flocculation ne peut servir à déterminer le titre antitoxique. S'il n'y a que de faibles différences dans la vitesse de flocculation des sérums pour la toxine, on obtient une concordance satisfaisante entre le titre calculé et le titre trouvé expérimentalement. Quant à la valeur Kf. d'un mélange à parties égales de deux sérums présentant des affinités différentes vis-à-vis de la toxine, elle n'est pas la moyenne de celle des deux sérums qui constituent le mélange, elle est beaucoup plus petite. Si au lieu d'effectuer les titrages par la

floculation, on procède selon la technique d'EHRLICH, on n'observe pas de tels phénomènes. La raison en est, on le sait, dans le fait que « la toxine et l'antitoxine restent pendant quelque temps dans le tissu sous-cutané du cobaye avant d'être résorbées, et se neutralisent réciproquement par la suite, même si l'affinité entre les deux corps n'est que médiocre » (MORGENROTH).

***Les titrages comparatifs effectués  
au moyen des deux méthodes***

A la suite des travaux de RAMON sur le titrage du sérum antidiphthérique par la floculation, et les résultats obtenus et publiés par lui, d'autres expérimentateurs étudièrent sa méthode et la mirent en pratique (SCHMIDT, RENAUX, SCHOLZ, etc.). Des titrages comparatifs furent effectués par eux avec les deux méthodes. Ce sont les résultats de ces essais que nous allons donner, ainsi que l'opinion des auteurs qui, ayant utilisé la méthode de Ramon, ont obtenu par elle des résultats en accord ou en désaccord avec les chiffres donnés par la méthode d'Ehrlich.

En 1923, SCHMIDT s'est livré à des recherches sur l'exactitude de la nouvelle méthode et, d'après lui, les résultats obtenus ont été vraiment excellents. Pour lui, la détermination de la valeur antitoxique des sérums étudiés s'est révélée exacte. Des titrages effectués simultanément par les méthodes d'Ehrlich

et de Ramon ont donné des résultats dont la concordance est presque parfaite. Les quelques résultats discordants proviennent, à son avis, du manque d'habitude de vérification du titre. A la suite de ces recherches, SCHMIDT donne les conditions de réussite et d'exactitude. Il faut : 1° une toxine forte ; 2° qu'on surveille avec grand soin l'apparition du précipité indicateur (examiner les tubes à essai à des intervalles de temps assez rapprochés).

RENAUX a aussi, de son côté, effectué des titrages comparatifs, et a obtenu par la méthode de Ramon des résultats très précis correspondant à ceux fournis par la méthode d'Ehrlich. Il n'a observé que peu de résultats différents, ceux-ci ne s'écartant pas de plus de 3 ou 4 % des titres obtenus sur l'animal — différences qui pourront être réduites par la répétition du titrage avec des quantités de sérum légèrement supérieures et légèrement inférieures à celle ayant donné le précipité indicateur. En résumé, RENAUX a obtenu des résultats excellents avec la méthode de Ramon : « La concordance est également manifeste si nous titrons, par comparaison, nos sérums avec des toxines fournies très amicalement par RAMON, ou des sérums parisiens, d'un titre donné, avec nos propres toxines. »

Hans SCHMIDT et Wilhelm SCHOLZ ont conclu que la valeur de floculation de la toxine diphtérique est la seule valeur toxique mesurable qui tienne compte de tous les composants du poison. Sa deux-centième partie représente l'unité de fixation, et si on désigne par pouvoir fixateur d'une toxine la quantité d'unités de

fixation contenues dans 1 cc., le nombre obtenu permet immédiatement de déterminer la valeur exacte totale d'une toxine. La signification de ce nombre, dans la pratique de la toxine-immunisation, montre que le pouvoir immunisant d'une toxine ne dépend que du nombre des unités de fixation contenues dans l'unité de volume. D'autre part, la connaissance du pouvoir fixateur permet une comparaison internationale des toxines de façon beaucoup plus précise que ne le permettait la connaissance des valeurs (Lo), (L +) dont on sait qu'elles sont variables. D'après SCHMIDT et SCHOLZ, le mélange diphtéritoxine et antitoxine parfaitement neutre, se détermine de la façon la plus exacte à l'aide de la détermination de la valeur Lf. La valeur (Lo), déterminée par l'expérience sur l'animal est moins utilisable dans ce but parce que sa détermination exacte est moins sûre que celle de Lf, et que la neutralisation « in vivo » ne tient pas compte de tous les composants de la toxine et différant par conséquent pour beaucoup de toxines, de la valeur Lf. Le rapport de (Lo) à Lf n'est égal ou très peu différent de 1 que dans les toxines très fraîches. Il augmente avec l'âge de la toxine par variation de (Lo), Lf restant pratiquement constant. L'accroissement numérique de (Lo) se fait parallèlement à la transformation de la toxine en toxoïde.

Auparavant, déjà, une série d'auteurs avait également obtenu de bons résultats avec la méthode de Ramon (MADSEN et SCHMIDT, MOLONEY et WELD, SCHOLZ, TAPIA, etc.).

En 1930 paraît un mémoire de Th. MADSEN et S.

SCHMIDT (1), dans lequel ces deux auteurs exposent les résultats de leurs plus récentes expériences et de leurs recherches concernant la réaction qui se produit entre la toxine et l'antitoxine diphtériques. MADSEN et SCHMIDT ont cherché à obtenir une détermination très exacte de la valeur antitoxique d'un sérum, en utilisant simultanément les deux méthodes de titrage, la méthode d'Ehrlich et celle de Ramon, et publient un tableau de titrage dans lequel les résultats obtenus avec les deux méthodes sont exposés.

| SÉRUM<br>N° | TITRE D'APRÈS |         |
|-------------|---------------|---------|
|             | Ramon         | Ehrlich |
| 754         | 95            | 160     |
| 539         | 140           | 250     |
| 748         | 30            | 56      |
| 812         | 635           | 600     |
| 811         | 1000          | 1000    |
| 799         | 560           | 560     |
| 805         | 850           | 800     |
| 806         | 525           | 500     |
| 824         | 1300          | 1250    |
| 802         | 1125          | 1250    |
| 778         | 625           | 560     |
| 782         | 550           | 550     |
| 823         | 800           | 710     |
| 788         | 1550          | 1600    |
| 775         | 775           | 710     |
| 760         | 800           | 800     |
| 803         | 1100          | 1100    |
| 752         | 1300          | 1300    |
| 825         | 360           | 350     |
| 737         | 120           | 75      |
| 789         | 125           | 40      |
| 486         | 57            | 40      |

(1) Toxine et antitoxine diphtériques. Th. MADSEN et S. SCHMIDT (Institut sérologique de l'Etat Danois).

MADSEN et SCHMIDT formulent ensuite les conclusions auxquelles leurs recherches à ce sujet ont donné lieu. Pour eux, les deux méthodes donnent des résultats également satisfaisants. Il y a cependant des réserves à faire, selon que l'on a à titrer des sérums dont l'avidité est plus ou moins grande pour la toxine — les premiers présentant en général un titre inférieur « *in vitro* » à celui indiqué par la mesure « *in vivo* », les seconds montrant des propriétés inverses. « La concordance est presque parfaite pour la majorité des sérums, dont la vitesse de floculation avec la toxine a une valeur moyenne. Les mélanges de toxine et de sérum à réaction lente sont résorbés dans le tissu sous-cutané des cobayes avant que la neutralisation entre les deux composants soit complète. Dans ce cas, il est possible de déceler des différences dans le titrage du sérum si, d'une part, on injecte les mélanges fraîchement préparés et si, d'autre part, on laisse en contact les deux constituants pendant un temps convenable avant l'injection. »

Pour MADSEN et SCHMIDT, les discordances entre les résultats obtenus avec les deux méthodes dépendent de la nature du sérum choisi pour l'étalonnage de la toxine-étalon. Les deux auteurs concluent en donnant les conditions de concordance entre les titrages « *in vitro* » et « *in vivo* » : Employer comme sérum-étalon un sérum à réaction moyenne. Si le sérum-étalon a une valeur  $K_f$  extrêmement petite, la toxine donnera des valeurs « *in vitro* » supérieures à celles obtenues par le titrage sur les cobayes. Avec un sérum-étalon dont l'avidité est faible, on doit constater que la plu-

part des sérums montrent un titre « in vitro » inférieur au titre « in vivo ».

Il est cependant très important de noter, à ce sujet, les expériences de KRAUS, BAECHER et LÖWENSTEIN. Les premières recherches de ces auteurs confirmèrent les résultats de RAMON, si bien que dans le compte rendu de leurs travaux, ils sont unanimes à déclarer que la méthode de RAMON donne des résultats au moins aussi bons que ceux obtenus par le titrage « in vivo ». Ces auteurs signalent les « variations parallèles » du pouvoir antitoxique et du pouvoir flocculant. Cependant, la modification indiquée par TAPIA permet d'arriver à une plus grande précision, « le calcul de la valeur antitoxique du sérum à l'aide des plus petites quantités de sérum encore susceptibles de donner des floculations dans une quantité donnée de toxine donne des résultats plus exacts », et ont obtenu avec cette méthode « toute une série de chiffres coïncidant bien avec ceux des essais sur l'animal ».

Cependant une étude ultérieure de la question a révélé à KRAUS, BAECHER et LÖWENSTEIN, des faits qui ébranlèrent leur croyance au parallélisme des pouvoirs antitoxique et précipitant. Après vérification des faits, ils arrivèrent à la conclusion suivante qui termine leurs recherches à ce sujet : « Tout ceci doit nous faire conclure que, dans l'antitoxine du sérum antidiphthérique, les pouvoirs antitoxique et précipitant ne sont pas identiques au sens banal du mot, ce qui correspond aux opinions primitives de KRAUS. » (LÖWENSTEIN).

LÖWENSTEIN cite ensuite ses recherches sur le pou-

voir flocculant d'une toxine par son sérum spécifique, et conclut à la non-identité du pouvoir flocculant et du pouvoir toxique de la toxine.

En somme : « Si nous jetons un coup d'œil d'ensemble sur les résultats obtenus, le parallélisme entre le pouvoir antitoxique et le pouvoir flocculant est tout d'abord « surprenant », mais les expériences de BAECHER, KRAUS et LÖWENSTEIN exigent que l'on sépare le plus possible ces différentes fonctions. » (LÖWENSTEIN.)

En résumé, parmi les auteurs ayant effectué des titrages comparatifs avec les deux méthodes, quelques-uns (RENAUX, etc.), ont trouvé dans les résultats obtenus « *in vivo* » et « *in vitro* » une concordance à peu de chose près, parfaite. D'autres (H. SCHMIDT et SCHOLZ) accordent même leur préférence à la méthode de Ramon. D'autres enfin (MADSEN et SCHMIDT S.) ont obtenu des résultats satisfaisants, mais font des réserves « selon que l'on a à titrer des sérums dont « l'avidité » est plus ou moins grande pour la toxine ». Il faut tenir compte, dans les résultats, de la vitesse de flocculation des sérums avec la toxine (nécessité d'une toxine à valeur moyenne). D'autres causes de discordance dépendent, d'après eux, de la nature du sérum choisi pour l'étalonnage de la toxine-étalon. Ils en arrivent aux conclusions suivantes : On peut obtenir de bons résultats dans le titrage du sérum antidiphthérique par la méthode de Ramon, à la condition cependant de n'avoir à titrer que des sérums à réaction moyenne, de tenir compte de la vitesse de flocculation, d'employer comme sérum-éta-

lon, un sérum à réaction moyenne. Quant à KRAUS, BAECHER et LÖWENSTEIN, après s'être ralliés quelque temps à l'opinion de RAMON, et avoir obtenu, grâce à l'emploi de la méthode, de bons résultats dans le titrage par la floculation (encore meilleurs par la modification de TAPIA), ils en sont arrivés, à la suite de travaux ultérieurs, à conclure à la non-identité des pouvoirs antitoxique et précipitant et, par suite, à l'impossibilité de doser l'un par l'autre ces pouvoirs.



L'AVIDITÉ  
LE TITRAGE PAR LA MÉTHODE  
DE MADSEN ET SCHMIDT



## L'avidité

### Le titrage par la méthode de Madsen et Schmidt

En fait, la méthode d'Ehrlich et le titrage en unités antitoxiques ne rendent sans doute pas compte des propriétés thérapeutiques du sérum antidiphthérique, opinion déjà formulée par ROUX, en 1900, après les essais de MOMONT et DANYSZ. KRAUS, pour serrer de plus près le problème du pouvoir curatif, chercha à apprécier « l'avidité » des sérums. Il s'agissait là, à vrai dire, d'une notion théorique basée sur le principe suivant : Si des sérums antidiphthériques de même taux antitoxique présentent des différences dans leur action thérapeutique, c'est que les uns ont, pour la toxine qu'ils neutralisent instantanément, une « avidité » extrême ; d'autres, de valeur curative plus faible, ont une avidité moindre et ne neutralisent la toxine qu'après un contact d'une heure ou deux. Si l'on imagine une telle réaction « in vivo » dans l'organisme traité, on conçoit que l'injection d'un sérum à avidité faible, laisse une marge d'inefficacité, malgré sa valeur antitoxique élevée. Cette notion établie par KRAUS, est restée théorique jusqu'aux expériences

de MADSEN et DREYER, en 1902. A ce moment, ces auteurs ont montré qu'un mélange toxine-antitoxine, trouvé neutre vis-à-vis des cobayes, pouvait encore tuer des lapins si on l'injectait à ces derniers par la voie intraveineuse. MORGENROTH montra plus tard (1904) que, si on laisse les deux éléments du mélange en contact pendant un certain temps, celui-ci se montre également inoffensif vis-à-vis des lapins. A la suite de cette constatation, MORGENROTH conclut que la neutralisation n'est pas instantanée (contrairement à l'opinion d'EHRlich), mais qu'elle s'effectue lentement.

La méthode de floculation a paru, un moment, fournir une méthode d'appréciation de cette avidité. Il existe, en effet, des sérums qui, en présence de la toxine, flocculent rapidement, en quelques minutes ; d'autres, de même titre antitoxique, et qui flocculent aux mêmes taux, ne le font qu'après huit, dix et vingt-quatre heures. Les différences dans la précocité d'apparition du premier flocculat, négligées par RAMON qui les tient pour non-interprétables, ont été étudiées de beaucoup plus près par MADSEN et SCHMIDT, en 1929 et 1930. Ces auteurs ont pensé que les sérums qui précipitent le plus rapidement sont peut-être ceux qui possèdent la plus grande valeur thérapeutique ; l'avidité pouvait, désormais, s'apprécier par la vitesse de floculation <sup>(1)</sup>. Poursuivant leurs recherches sur ce point, ils ont constaté que la vitesse de neutralisation, comme la vitesse de floculation, est indépendante du pouvoir

(1) « La vitesse avec laquelle floccule un sérum antidiphtérique dépendant de la quantité de sérum entrant dans la réaction toxine-antitoxine, il est possible d'exprimer la valeur Kf

antitoxique du sérum, elle dépend de l'animal fournisseur de sérum, et paraît à peu près constante au cours de l'immunisation.

La vitesse de floculation entre des sérums antidiphthériques d'origines diverses et une toxine déterminée est très variable, mais reste à peu près constante pour le sérum provenant d'un même individu, même si son pouvoir antitoxique varie considérablement au cours de l'immunisation.

On retrouve également « in vivo » une différence

d'un sérum par un nombre qui indique la quantité du principe floculant par centimètre cube de sérum, c'est-à-dire de fixer une unité pour la vitesse de floculation. La valeur Kf étant inversement proportionnelle à la quantité du principe floculant, on peut calculer le nombre en « unités floculantes »

d'un sérum comme suit :  $\frac{1}{\text{dose neutralisante}} \cdot \frac{1}{K} = \text{l'unité.}$

La grandeur de cette unité, que nous nous proposons d'appeler « l'unité de floculine » U. F., est fixée arbitrairement en nous basant sur un sérum réagissant très lentement. Ce sérum floculait avec notre toxine-Standard de 7 unités (bain-marie à 40°) à la dose de 0,5 cc. (dose neutralisante) en 2.000 minutes. L'unité était ensuite fixée de telle sorte que 1 cc. du sérum en question renfermait une unité :

$$\frac{1}{0,5} \times \frac{1}{2.000} \cdot 1.000 = \text{une unité.}$$

Le nombre en UF d'un sérum déterminé est donc calculé d'après la formule :  $\frac{1.000}{\text{dose neutralisante} \times Kf} \times \text{nombre en UF.}$

La seule condition d'un emploi général de cette expression pour la vitesse de floculation est que la réaction de Ramon soit exécutée suivant une technique uniforme (10 cc. de toxine), (bain-marie à 40° C., immersion des tubes jusqu'aux deux tiers de la colonne liquide). Des toxines d'origine et de constitution très diverses donnent toujours à peu près le même nombre d'unités de floculine. »

(J.-R. MÖRCH, *Société danoise de Biologie*, août-septembre 1931.)

correspondante entre la vitesse de neutralisation de divers sérums et la toxine, différence qui ne peut être mise en évidence par des injections sous-cutanées à des cobayes, mais peut être constatée par l'injection intraveineuse à des lapins. En effet, une toxine neutralisée par son sérum peut être inoffensive pour le cobaye, mais encore pathogène pour le lapin.

L'avidité, en fait, ne peut s'éprouver que par un titrage comparatif sur lapins et sur cobayes, et non pas seulement par la vitesse de floculation.

MADSEN et SCHMIDT, en examinant un grand nombre de sérums, purent se rendre compte que les sérums donnant des réactions très rapides en présence de la toxine (sérums à très grande avidité), donnent, en général, le même titre, soit que l'on effectue le titrage sur des cobayes par voie sous-cutanée, soit que l'on utilise des lapins (voie intraveineuse). Les sérums à vitesse de réaction moyenne, donnent sur lapins un titre inférieur à celui obtenu par détermination sur cobayes. Quant aux sérums à vitesse de réaction lente, la détermination de leur titre sur lapins ne donne qu'un résultat très inférieur à celui obtenu par titrage sur cobayes.

Si, avant d'injecter le mélange toxine-antitoxine aux lapins, on le laisse reposer à 40° pendant un temps suffisant à sa neutralisation complète, on peut, presque toujours, obtenir un accord presque absolu entre le titre déterminé sur cobayes d'une part, et celui déterminé sur lapins d'autre part. MADSEN et SCHMIDT font remarquer que, dans le cas d'un tel sérum à réaction très lente, il est impossible d'obtenir une

concordance entre le titre « in vivo » et le titre « in vitro », ce dernier étant toujours plus élevé que le premier. Dans le cas d'un sérum réagissant lentement, on peut, même sur cobayes, obtenir un titre plus élevé, si l'on a attendu la neutralisation du mélange avant de l'injecter. Les sérums à réaction très rapide donnent un titre inférieur, déterminé « in vitro » que déterminé « in vivo ». On constate cependant dans ce cas une coïncidence remarquable des titres déterminés respectivement sur cobayes et sur lapins.

Pour MADSEN et SCHMIDT, une des conditions les plus importantes pour obtenir un titre identique sur cobayes et sur lapins est de laisser le mélange à l'étuve à 40° pendant un temps suffisant pour que la neutralisation se produise. On peut alors obtenir une concordance presque absolue entre le titre déterminé sur cobayes et celui déterminé sur lapins. Il faut noter cependant que l'avidité des sérums pour la toxine joue un grand rôle, et il arrive que certains sérums réagissent si lentement avec la toxine que, même sur cobaye et après avoir laissé quelques heures le mélange à l'étuve, on peut obtenir un titre plus élevé que si l'on injecte le mélange dès sa préparation.

Le problème du titrage des sérums antidiptériques se présente sous un nouvel aspect. « Il serait commode, si l'on pouvait se borner à faire un titrage par la méthode de flocculation. Mais nous avons vu que la vitesse de flocculation n'est pas toujours l'indicateur fidèle de l'avidité entre toxine et antitoxine. Le titrage sur lapin, au contraire, nous paraît répondre à ce but. Dans le cas où l'on constate une différence

sensible du titre déterminé d'une part sur cobayes et, d'autre part, sur lapins, on saura que la réaction entre toxine et antitoxine ne s'effectue pas immédiatement. » (MADSEN et S. SCHMIDT.)

Si les résultats obtenus dans la détermination du titre antitoxique d'un sérum antidiphtérique, d'une part sur cobayes, d'autre part sur lapins, présentent entre eux de trop grandes différences, le sérum ne doit pas être utilisé en clinique humaine.

La recherche de l'avidité peut sans doute apporter de grands perfectionnements au titrage des sérums antidiphtériques, mais il convient cependant d'ajouter que le titrage en unités antitoxiques garde sa valeur et ne doit point faire l'objet de critiques trop serrées. Ces dernières années, malgré les résultats thérapeutiques remarquables du sérum, on l'a accusé d'inefficacité. La diphtérie a augmenté de fréquence ces dernières années dans tous les pays et, en France, la morbidité diphtérique a passé de 11.000 à 14.289 en 1927 et 19.000 en 1928. Mais surtout sa gravité a augmenté. On a alors soupçonné le sérum de ne point donner ce que l'on attendait de lui et, parmi les arguments invoqués, on a incriminé le titrage en unités antitoxiques, qui ne rendrait pas compte de son activité réelle. Dans des travaux récents, MM. RAMON et DEBRÉ ont fait justice de ces accusations. Au moyen de titrages de sérums préparés soit avec des doses massives de corps microbiens, soit avec de l'anatoxine, soit avec des toxines de diverses provenances, ils ont montré que la valeur curative d'un sérum dépend de sa teneur en antitoxine. Le sérum antidiphté-

rique est un dans son action thérapeutique expérimentale. Il agit uniquement grâce à la quantité, à la qualité de son antitoxine. DEBRÉ et RAMON concluent en disant « que l'on n'est pas autorisé à abandonner la doctrine d'après laquelle le pouvoir préventif ou curatif d'un sérum dépend essentiellement de sa valeur antitoxique ».



## LES AUTRES MÉTHODES DE TITRAGE



## Les autres méthodes de titrage

Aux méthodes de titrage du sérum antidiphtérique que nous venons d'exposer, il convient d'ajouter les diverses recherches qui ont été entreprises, soit pour trouver un procédé exact de mise en évidence de l'antitoxine, soit même pour donner une technique précise pour mesurer l'activité du sérum antidiphtérique.

### *La méthode de Marx*

En premier lieu viennent les travaux de MARX. On avait remarqué que certains sujets présentaient, vis-à-vis de la diphtérie, une immunité certaine. Bien des expérimentateurs attribuèrent à la présence d'antitoxine dans leur sang, la résistance de ces individus à l'infection. C'est à ce sujet que MARX entreprit des recherches qui aboutirent à la confirmation de cette hypothèse.

La méthode de Marx n'est pas une méthode de titrage du sérum antidiphtérique, faite dans un but thérapeutique. Son but est de mettre en évidence et de doser de très petites quantités d'antitoxine sanguine. Dans un premier temps, on recherche sur co-

baye quelle est la plus petite dose de toxine encore capable de donner de l'œdème à l'animal. Ayant déterminé cette dose, on mélange, dans un second temps, une partie du sérum à étudier à cette dose fixe de toxine. Si le mélange injecté au cobaye ne détermine chez lui aucun œdème, c'est que la quantité de sérum employée contenait une quantité d'antitoxine suffisante pour préserver l'animal de tout phénomène local d'infection diphtérique.

La technique découverte et utilisée par MARX a permis à cet auteur de mettre en évidence de très petites quantités d'antitoxine ( $1/240$  d'U. A. dans 1 cc. de sérum) présentes dans le sang de divers individus.

### *La méthode de Behring*

BEHRING essaya de mettre en œuvre une méthode dont l'application à la recherche de l'activité du sérum antidiphtérique lui permit d'arriver à une notion exacte de la valeur de ce sérum. Pour que cette méthode eût une portée scientifique, il fallait trouver une unité de mesure. BEHRING estima l'activité d'un sérum d'après la quantité nécessaire pour immuniser 1 gramme d'animal contre un volume de toxine, sûrement mortel, injecté douze heures après le sérum. Un sérum est, par conséquent, actif au millième, quand 1 centimètre cube de ce sérum immunise 1 kilogramme de cobaye contre une dose de toxine capable de tuer dans un délai connu.

BEHRING utilisa ensuite une autre unité de mesure; l'unité est constituée par la quantité de sérum nécessaire pour immuniser 5.000 grammes de cobaye (soit dix cobayes de 500 grammes) contre une dose dix fois mortelle d'une culture diphtérique âgée de deux jours, le sérum étant injecté 24 heures avant la culture. On apprécie ainsi la propriété thérapeutique du sérum contre l'infection et non contre l'intoxication.

### ***La méthode de Rohmer***

Elle a pour but, comme la méthode de Marx avec laquelle elle s'apparente beaucoup, de rechercher de très faibles doses d'antitoxine dans le sérum d'hommes ou d'enfants réfractaires à la diphtérie ou convalescents de cette maladie. On recherche la dose de sérum à ajouter à une toxine de taux connu, pour que l'injection du mélange par voie intradermique ne fasse plus apparaître sur le cobaye la réaction dermique caractéristique. C'est, en somme, une méthode qui cherche à neutraliser la toxine, afin que cette toxine ne donne plus une réaction de Schick positive chez le cobaye neutre.

### ***La méthode de Ramon et Debré***

Elle est destinée, elle aussi, à déceler de très faibles doses d'antitoxine chez les sujets vaccinés par l'anatoxine. Elle est dérivée de la méthode d'Ehrlich.

RAMON et DEBRÉ déterminent la quantité de toxine diphtérique qui correspond à  $1/30$  (L+). Ils ajoutent à cette dose  $1/30$  (L+) répartie dans différents tubes, des quantités croissantes de sérum à doser, par exemple : 1 cc.-0, 30 cc.-0, 1 cc. Ils injectent ces mélanges au cobaye, et ils retiennent, comme dans la méthode d'Ehrlich, les cobayes qui meurent en 3 jours. Ils titrent en somme avec des doses correspondant à  $1/30$  (L+) au lieu de 1 (L+).

ETUDE COMPARÉE  
DES MÉTHODES DE TITRAGE  
DU SÉRUM ANTIDIPHTÉRIQUE



## Etude comparée des méthodes de titrage du sérum antidiphthérique

A l'Institut Bactériologique de Lyon, les sérums sont titrés depuis très longtemps par la méthode d'Ehrlich. Le titrage est effectué environ toutes les deux saignées, pendant tout le temps que dure la production de sérum chez l'animal. Depuis la publication de la méthode de Ramon, les deux méthodes ont été employées comparativement, au moins pour certaines saignées. Nous présentons dans les tableaux qui suivent, les résultats des saignées où les deux méthodes ont été utilisées simultanément. Afin de pouvoir juger des chiffres et des taux indiqués par ces titrages, quelques renseignements seront nécessaires sur les méthodes et sur les détails des techniques suivies.

### *Méthode d'Ehrlich*

L'unité antitoxique par rapport à laquelle les titres sont donnés est l'unité américaine du Laboratoire d'Hygiène de Washington. Le titrage de la dose limite mortelle (L+) de la toxine se fait concurremment à celui des sérums à étudier. On utilise, dans ce but, une toxine conservée au laboratoire, dont la

EXEMPLE DE TITRAGE EFFECTUÉ D'APRÈS LA MÉTHODE D'EHRLICH  
A L'INSTITUT BACTÉRIOLOGIQUE DE LYON

|                                    | POIDS<br>DES COBAYES | CC.                 |                |
|------------------------------------|----------------------|---------------------|----------------|
| Témoins                            | 210                  | L + (0,2) + 0,5U.A. | + en 24 heures |
|                                    | 170                  | » » + 0,6U.A.       | + en 24 heures |
|                                    | 230                  | » » + 0,7U.A.       | + en 24 heures |
|                                    | 230                  | » » + 0,8U.A.       | + en 24 heures |
| Coefficient d'unité<br>antitoxique | 230                  | » » + 0,9U.A.       | + en 48 heures |
| 1                                  | 200                  | » » + 1, U.A.       | + en 3 jours   |
|                                    | 190                  | » » + 1,2U.A.       |                |
|                                    | 240                  | » » + 1,3U.A.       |                |
|                                    | 280                  | » » + 1,4U.A.       |                |
| Sérum<br>de « Apte ».              | 200                  | L+ (0,2) + 1/150    | Tous survivent |
| Saignée<br>du 24-4-25              | 260                  | » » + 1/200         |                |
|                                    | 225                  | » » + 1/250         |                |
| Taux du sérum :                    | 250                  | » » + 1/300         |                |
| 350 × 1 = 350 U.A.<br>(+)          | 280                  | » » + 1/350         |                |
| Sérum                              | 175                  | L+ (0,2) + 1/150    | + en 3 jours   |
| de « Bijou ».                      | 170                  | » » + 1/200         |                |
| Saignée<br>du 24-4-25              | 200                  | » » + 1/250         |                |
|                                    | 175                  | » » + 1/300         |                |
| Taux du sérum :                    | 230                  | » » + 1/350         | + en 48 heures |
| 150 × 1 = 150 U.A.                 |                      |                     |                |
| Sérum                              | 275                  | L+ (0,2) + 1/150    | Survit         |
| de « Piquet ».                     | 280                  | » » + 1/200         |                |
| Saignée<br>du 24-4-25              | 210                  | » » + 1/250         |                |
|                                    | 220                  | » » + 1/300         |                |
| Taux du sérum :                    | 260                  | » » + 1/350         | + en 48 heures |
| 300 × 1 = 300 U.A.                 |                      |                     |                |
| Sérum                              | 270                  | L+ (0,2) + 1/50     | + en 6 jours   |
| de « Houdan ».                     | 180                  | » » + 1/100         |                |
| Saignée<br>du 24-4-25              | 225                  | » » + 1/150         |                |
|                                    | 250                  | » » + 1/200         |                |
| Taux du sérum :                    | 210                  | » » + 1/250         | + en 48 heures |
| 180 × 1 = 180 U.A.                 |                      |                     |                |

dose (L +) est connue et correspond à environ 0,2 centimètre cube. Cette dose (L +) est mise au contact, pendant une demi-heure, à la température du laboratoire, avec des doses croissant de 1/10 cc. en 1/10 cc. de sérum étalon, de 0,50 U. A. à 1,5 U. A. Ces mélanges témoins sont inoculés sous la peau de la cuisse de cobayes. L'animal mort en trois jours avec la plus faible dose de sérum, indiquera la vraie valeur de (L +) de la toxine utilisée. La dose de sérum donnera un coefficient qui permettra de comparer les sérums à titrer au sérum étalon américain. D'un autre côté, on fait des mélanges d'une dose (L +) avec des quantités croissantes de chaque sérum à étudier. Ces mélanges sont inoculés dans les mêmes conditions que les mélanges témoins. L'animal survivant au troisième jour avec la plus petite dose de sérum indique la quantité minimum de sérum qui protège contre une dose (L +). On obtient ensuite le titre en multipliant cette plus petite dose efficace par le coefficient connu au moyen des animaux témoins. Ce titre est alors exprimé en U. A. (Laboratoire de Washington). Une telle méthode paraît plus précise, parce qu'elle rend compte des variations qui auraient pu se produire dans l'évaluation de la dose (L +).

Afin d'être dans une plus grande certitude de donner un titre en U. A. laissant une marge suffisante de sécurité, on tient compte pour le calcul de l'U. A. de chaque sérum, non pas du cobaye qui meurt en trois jours, mais du premier cobaye qui survit dans la série de ceux qui ont été inoculés. Ainsi compris, les chiffres que nous donnons sont inférieurs à ceux que

pourrait donner la véritable technique d'après la méthode d'Ehrlich pratiquée dans les autres laboratoires. Un sérum évalué à 350 U. A. par centimètre cube, serait apprécié dans les autres laboratoires à 400 U. A. ou 450 U. A.

### *Méthode de Ramon*

La méthode de Ramon est utilisée en suivant les indications données par cet auteur, mais en employant 10 centimètres cubes de toxine. Chaque sérum est mis en présence de ces 10 cc. de toxine, à des doses qui sont: 0,05 cc. — 0,1 cc. — 0,2 cc. — 0,3 cc. — 0,4 cc. — 0,5 cc. — 0,6 cc. — 0,7 cc. — 0,8 cc. — 0,9 cc. — 1 cc. — 1,2 cc. Les mélanges, après agitation, sont laissés à la température du laboratoire et lus d'heure en heure. Le calcul des unités antitoxiques se fait en comparant deux sérums dont l'un est pris arbitrairement pour étalon. Soit un sérum qui titre par la méthode d'Ehrlich 300 U. A. et floccule à 0,2, on dit qu'un autre sérum titre 150 U. A. s'il floccule à 0,4 ; 600 U. A. s'il floccule à 0,1, etc. Le sérum étalon est choisi parmi ceux qui donnent un titre très régulier par la méthode d'Ehrlich, et flocculent à des doses faibles. Il est à noter que le sérum ne floccule en premier lieu jamais au delà de 1 centimètre cube (pour 10 cc. de toxine). La flocculation s'effectue en général entre 0,2 cc. et 0,6 cc. de sérum pour 10 centimètres cubes de toxine. Mais, malgré la précaution prise de ne laisser les tubes qu'à une température de 20° (tempéra-

ture du laboratoire), on assiste souvent à une floculation dans plusieurs tubes à la fois (par exemple dans ceux contenant 0,4 — 0,5 — 0,6 cc. de sérum). Et ultérieurement ces tubes renferment des flocculats d'épaisseurs comparables. Il est donc très difficile de savoir quel est le tube dans lequel la floculation est apparue en premier lieu. Dans ce cas, on choisit le tube intermédiaire (celui contenant 0,5 cc. de sérum pour l'exemple choisi). Il va de soi qu'un tel choix est un peu arbitraire, et que l'on peut obtenir ainsi des résultats très différents des titres réels. On a remarqué, comme l'a d'ailleurs fait observer GLENNY, que la floculation s'établit parfois dans des tubes assez éloignés les uns des autres, par exemple dans ceux contenant 0,2 cc. et 0,8 cc. de sérum. Dans ces cas, on choisit pour apprécier le titre, le mélange ayant flocculé avec la plus petite dose de sérum.

Enfin (fait déjà signalé par tous les auteurs), on a noté l'apparition parfois très rapide de la floculation (en quelques minutes), phénomène qui a suggéré à MM. MADSEN et SCHMIDT l'idée d'effectuer des recherches sur l'« avidité » du sérum antidiphthérique. Il n'a cependant pas été possible de se faire une opinion précise à ce sujet. Il semble que ce sont, en général, les sérums dont le taux en unités-Ehrlich est très élevé qui flocculent le plus rapidement. En observant dans la série des tubes ayant flocculé au bout de quarante-huit heures le tube dans lequel la première floculation est apparue, non plus sous l'influence du temps, mais sous l'influence de la dose de sérum, on constate que les chiffres obtenus sont comparables à ceux donnés

par la méthode de Ramon proprement dite. Ces chiffres ne sont pas, bien entendu, retenus pour les titrages. Ceux fournis par la méthode de Ramon authentique sont donnés plus loin.

***Etude comparative des titrages  
par les deux méthodes***

Nous allons donner ici les résultats pour une série de sérums. Nous indiquons pour chacun des chevaux une série de saignées échelonnées en général sur deux années, et, pour chaque saignée, le titre brut fourni par la méthode de Ramon dans la première colonne et celui donné par la méthode d'Ehrlich dans la seconde colonne. On voit, par la lecture de ces tableaux, que les résultats sont loin d'être concordants. En particulier, le titre donné par la méthode de Ramon est, d'une façon générale, plus élevé que celui fourni par la méthode d'Ehrlich, et la différence est parfois très notable. Il est rare qu'elle excède le double de la valeur du titre-Ehrlich, mais ce fait est quelquefois constaté.

Lorsque l'on suit les résultats obtenus par une série successive sur un même cheval, on voit que ce titre n'est pas toujours constant. Le titre du sérum présente des variations subites, que la méthode d'Ehrlich met plus en relief. Dans une série d'essais qui ont été effectués, on a étudié le titrage par la méthode de Ramon avec une toxine préparée sur un milieu cui-

| SÉRUMS      | DATE     | TITRE |         | SÉRUMS        | DATE     | TITRE |         |
|-------------|----------|-------|---------|---------------|----------|-------|---------|
|             |          | Ramon | Ehrlich |               |          | Ramon | Ehrlich |
|             | 4- 5-25  | 415   | 375     | Sérum         | 16- 5-30 | 50    | 50      |
|             | 15- 5-25 | 160   | 275     | de            |          |       |         |
|             | 31-12-25 | 225   | 325     | « Elina »     | 14-11-30 | 80    | 70      |
| Sérum       | 8- 7-26  | 300   | 500     |               | 16- 5-30 | 300   | 300     |
| de          | 23- 4-27 | 300   | 250     |               | 14-11-30 | 420   | 420     |
| « Apte »    | 22-11-29 | 160   | 100     | Sérum         | 30- 3-31 | 150   | 300     |
|             | 16- 5-30 | 120   | 150     | de            | 15- 5-31 | 1600  | 700     |
|             | 14-11-30 | 280   | 70      | « Pari-       | 30- 7-31 | 600   | 600     |
|             | 30- 3-31 | 170   | 150     | sienne »      | 26- 2-32 | 400   | 200     |
| Sérum       | 4- 5-25  | 415   | 225     |               | 1- 6-32  | 900   | 300     |
| de          | 15- 5-25 | 210   | 200     |               | 16- 5-30 | 150   | 250     |
| « Bijou »   | 31-12-25 | 60    | 175     | Sérum         | 14-11-30 | 210   | 210     |
|             |          |       |         | de            | 30- 3-31 | 170   | 75      |
| Sérum       | 4- 5-25  | 325   | 325     | « Miranda »   | 15- 5-31 | 600   | 150     |
| de          | 15- 9-25 | 160   | 200     |               | 30- 7-31 | 100   | 450     |
| « Piquet »  | 31-12-25 | 225   | 225     |               | 26- 2-32 | 400   | 100     |
|             |          |       |         |               | 16- 5-30 | 150   | 180     |
| Sérum       | 4- 5-25  | 325   | 150     | Sérum         | 14-11-30 | 210   | 210     |
| de          | 15- 9-25 | 190   | 275     | de            | 15- 5-31 | 530   | 75      |
| « Houdan »  | 4- 5-26  | 280   | 280     | « Tomy »      | 30- 7-31 | 100   | 75      |
|             |          |       |         |               | 26- 2-32 | 40    | 75      |
| Sérum       | 15- 9-25 | 160   | 200     |               |          |       |         |
| de          | 8- 7-26  | 265   | 500     | Sérum         | 14-11-30 | 280   | 175     |
| « Diane »   | 9- 8-28  | 170   | 260     | de            | 15- 5-31 | 1600  | 900     |
|             |          |       |         | « Josseline » | 30- 7-31 | 2400  | 900     |
| Sérum       | 8- 7-26  | 300   | 300     |               | 26- 2-32 | 400   | 300     |
| de          | 9- 8-28  | 104   | 400     |               | 14-11-30 | 210   | 70      |
| « Parieur » | 22-11-29 | 160   | 150     | Sérum         | 30- 3-31 | 150   | 150     |
|             | 9- 8-28  | 520   | 520     | de            | 30- 7-31 | 400   | 300     |
| Sérum       | 10- 5-29 | 600   | 600     | « Mari-       | 26- 2-32 | 200   | 140     |
| de          | 22-11-29 | 200   | 150     | nette »       | 1- 6-32  | 450   | 200     |
| « Coconas » | 16- 5-30 | 120   | 200     |               |          |       |         |
|             | 14-11-30 | 840   | 420     | Sérum         | 14-11-30 | 170   | 50      |
|             |          |       |         | de            | 30- 3-31 | 120   | 50      |
| Sérum       | 10- 5-29 | 300   | 300     | « Hiram »     | 15- 5-31 | 530   | 75      |
| de          | 22-11-29 | 160   | 200     |               |          |       |         |
| « Zamis »   | 10- 3-30 | 170   | 100     | Sérum         | 14-11-30 | 420   | 50      |
|             | 16- 5-30 | 150   | 80      | de            | 30- 3-31 | 300   | 150     |
|             | 10- 5-29 | 600   | 300     | « Athos »     | 30- 7-31 | 480   | 300     |
|             | 22-11-29 | 200   | 300     |               | 26- 2-32 | 200   | 200     |
| Sérum       | 10- 3-30 | 300   | 300     |               | 14-11-30 | 210   | 50      |
| de          | 16- 5-30 | 150   | 200     | Sérum         | 30- 3-31 | 300   | 300     |
| « Noiraud » | 14-11-30 | 280   | 210     | de            | 30- 7-31 | 480   | 400     |
|             | 30- 3-31 | 240   | 300     | « Mirba »     | 26- 2-32 | 400   | 100     |
|             | 26- 2-32 | 200   | 100     |               | 1- 6-32  | 300   | 300     |
|             | 10- 5-29 | 600   | 300     |               |          |       |         |
|             | 22-11-29 | 400   | 400     | Sérum         | 14-11-30 | 170   | 50      |
| Sérum       | 10- 3-30 | 10    | 400     | de            |          |       |         |
| de          | 16- 5-30 | 150   | 300     | « Coque-      |          |       |         |
| « Galopin » | 14-11-30 | 140   | 140     | relle »       | 30- 7-31 | 480   | 400     |
|             | 30- 7-31 | 100   | 450     |               |          |       |         |
|             | 26- 2-32 | 40    | 100     |               |          |       |         |
|             | 1- 6-32  | 450   | 100     |               |          |       |         |

vré. On a constaté que les toxines cuivrées donnaient un précipité beaucoup plus rapide, un taux de floculation inférieur en général et, par conséquent, un chiffre plus élevé d'unités antitoxiques. Il y a donc une grosse influence de la préparation de la toxine sur le taux de floculation.

Sans vouloir commenter plus longtemps les résultats qui se lisent d'eux-mêmes dans nos tableaux, nous nous trouvons dans l'obligation de constater que la méthode de Ramon ne donne qu'une approximation par rapport à la méthode d'Ehrlich. Son principe même pouvait d'ailleurs laisser prévoir des différences. La méthode d'Ehrlich ne recherche en effet qu'une protection relative et nous avons indiqué les raisons pour lesquelles Ehrlich s'était arrêté à la recherche d'une dose (L+) partiellement neutralisée. La méthode de Ramon prétend, au contraire, donner pour chaque sérum le taux de neutralisation absolue de la toxine par le sérum. Les tubes qui sont ou avant ou après celui qui a floculé en premier lieu contiennent, dit Ramon, soit un excès de toxine, soit un excès de sérum. Ceci est en contradiction avec l'expérience d'Ehrlich.

Les chiffres que nous donnons sont en contradiction avec les résultats obtenus et publiés par beaucoup d'auteurs. Cependant, dans les travaux de MM. MADSEN et SCHMIDT, des différences analogues à celles que nous avons constatées sont expressément signalées. Ainsi, dans un travail que nous avons analysé, dont nous avons relevé les titres dans le tableau publié page 81, on peut lire que certains sérums ont donné

par la méthode de Ramon, des doses très différentes de celles obtenues par la méthode d'Ehrlich, et que, souvent, des variations égales au tiers des taux d'unités antitoxiques sont notées. Nous avons également indiqué les critiques faites par LÖWENSTEIN à la méthode de Ramon.

En fait, nos résultats discordants peuvent s'expliquer : La plupart des sérums étudiés sont des sérums à floculation rapide. Les résultats ont, dans la majorité des cas, été lus après six heures d'incubation à la température du laboratoire. Il est probable que cette vitesse de floculation a exercé une influence notable sur nos chiffres. Nous avons vu plus haut que MADSEN et SCHMIDT signalent les erreurs de la méthode de floculation lorsque celle-ci est recherchée avec des sérums très « avides ».

En second lieu, il a été très souvent observé une floculation simultanée dans deux ou trois tubes voisins, par exemple ceux qui, pour 10 cc. de toxine, ont 0,2 cc. — 0,3 cc. — 0,4 cc. de sérum. Dans ces conditions, la zone est trop large. Le chiffre retenu est, en général, le chiffre moyen (0,3 pour l'exemple choisi); mais on obtient ainsi un taux de sérum très supérieur à celui qu'eût donné le chiffre 0,4 s'il avait été retenu.

Enfin, des sérums de même valeur antitoxique flocculent souvent l'un à 0,2, l'autre à 0,4 par exemple, pour 10 cc. de toxine. Dans ce cas, la différence de taux indiquée est double du chiffre obtenu par la méthode d'Ehrlich pour le sérum ayant flocculé à 0,2. Tout ceci explique les divergences. La méthode de

floculation ne paraît concorder que pour les sérums de taux très moyen : 150 U. A. à 350 U. A., flocculant très lentement en vingt heures à quarante-huit heures. Sitôt que l'on s'écarte de cette moyenne, que le taux du sérum s'élève au delà de 400 U. A., que le sérum floccule rapidement, que la toxine a une aptitude flocculante active (les toxines cuivrées, par exemple), que la floculation initiale s'effectue elle-même avec des taux faibles de sérum, les réponses de cette réaction ne sont plus les mêmes que celles données par la méthode d'Ehrlich.

Il est, d'autre part, extrêmement curieux que la méthode de floculation ne puisse donner des résultats qu'avec le sérum antidiphthérique, et l'on sait que les tentatives faites pour titrer les sérums antitétanique, antidysentérique, etc., par cette méthode, ont échoué. Ceci ne revient pas à dire que la méthode de Ramon ne soit précieuse. Elle rend de très grands services, de par sa simplicité. Elle peut rendre compte d'une façon approximative de la valeur d'un sérum. On peut la substituer de temps à autre à la méthode d'Ehrlich pour suivre un sérum, et elle doit continuer à être employée. Mais il ne semble pas que l'on doive tabler exclusivement sur elle, surtout si l'on veut donner un chiffre très précis de la valeur en unités antitoxiques d'un sérum.

Il va sans dire que la méthode d'Ehrlich n'est point elle-même sans soulever des critiques. Si elle est très intéressante par la rigueur scientifique avec laquelle elle a été établie par Ehrlich, si elle est très commode par la possibilité d'avoir un chiffre standard d'unités

antitoxiques, elle a contre elle le très gros inconvénient de ne point donner d'indications sur la valeur thérapeutique, proprement dite, du sérum. Les mélanges toxine-antitoxine que l'on prépare au laboratoire sont très différents des mélanges toxine-antitoxine qui s'effectuent dans l'organisme des individus traités. D'autre part, il semble bien qu'une notion « d'avidité » du sérum intervienne. A ce point de vue, les expériences faites par KRAUS, MADSEN et SCHMIDT sont du plus grand intérêt et doivent être envisagées de très près.



## CONCLUSIONS

I. — Parmi les méthodes de titrage proposées pour étalonner le pouvoir antitoxique du sérum antidiph-térique, deux seulement ont une portée pratique : la méthode d'Ehrlich et la méthode de Ramon.

II. — Les titrages effectués à l'Institut Bactériolo-gique de Lyon l'ont toujours été comparativement par ces deux méthodes. Nous présentons ici les résultats de plusieurs années de pratique sérothérapique.

III. — La méthode de Ramon donne des taux qui sont en général proportionnels, mais non identiques à ceux obtenus par la méthode d'Ehrlich. Ses résul-tats ne s'accordent pas avec ceux de la méthode d'Ehr-lich dans les cas de modifications subites présentées par les sérums des chevaux immunisés. Elle donne parfois des résultats divergents. En général, le titre en unités antitoxiques qu'elle indique est plus élevé que le taux indiqué par le titrage d'Ehrlich.

IV. — Il semble donc que la méthode d'Ehrlich, seule méthode d'appréciation « in vivo », seule mé-

thode biologique précise, doit rester la méthode standard du titrage des sérums thérapeutiques.

V. — Il semble y avoir un intérêt à étudier les procédés récemment décrits par MADSEN et SCHMIDT, et chercher à apprécier « l'avidité » des sérums pour la toxine.

|              |                           |
|--------------|---------------------------|
| <i>Vu :</i>  | LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE, |
| LE DOYEN,    | Paul COURMONT,            |
| JEAN LEPINE. |                           |

*Vu et permis d'imprimer*

LYON, le 3 Novembre 1932.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ.

A. LIRONDELLE.

## BIBLIOGRAPHIE

- AMIRADZIBI et KACZYNSKI. — *Zeitschrift für Immunitätsf. I. origin.*, 6, 1910, p. 697.
- BESSON. — *Technique microbiologique et sérothérapique*, J.-B. Baillière et F., 1921.
- CALMETTE et MASSOL. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1909, p. 105.
- CLAVEL (M<sup>me</sup>). — Etude analytique de la toxine diphtérique. *Thèse*, Lyon, 1927.
- DANYSZ. — Sur les mélanges toxine-antitoxine. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902, 16, pp. 331-345.
- DEBRÉ, RAMON et M<sup>lle</sup> PRIEUR. — *Société Médicale des Hôpitaux de Paris*. Séance du 3-7-1931.
- DEBRÉ, RAMON, THIROLOIX. — *Annales de Médecine*, T. XXIX, n° 5, mai 1931.
- *Société Médicale des Hôpitaux de Paris*. Séance du 17-4-1931.
- EHRlich. — *Berl. Klin. Wochenschrift*, 1898.
- *Klinisches Jahrbuch*, 1898. Wertbemessung des Dipht.
- *Berl. Klin. Wochenschrift*, 1903, 35-37.
- FORSTER. — *Journ. of inf. diseases*, 1923, 32, p. 105.
- GLENNY and OKELL. — *Journ. of Path. and Bact.*, 1924-27, pp. 187-200 ; 1925-28, p. 317.
- GLENNY, BARBARA, HOPKINS and POPE. — *Journ. of Path. and Bact.*, 1924, 27, p. 261.
- GLENNY, POPE and WADDINGTON. — *Journ. of Path. and Bact.*, 1925, 28, pp. 279-303.

- JACOBY. — *Beiträge z. Chem. Physiol. und Path.*, 1.
- JONESCU MIHAESTI et DAMBOVICEANU. — Sur la neutralisation de la toxine diphtérique par l'antitoxine correspondante. Influence de la réaction du milieu. *C. R. Soc. de Biologie*, 1924, 91, 504.
- KRAUS und BACHER. — Flockulation und Avidität der antitoxischen Diphtherieheilsersa. *Wien. Klin. Wochenschrift*, 41, 1928, Jahrgang.
- KRAUS und SCHWONER. — *Centrallb. für Bakter*, I, 1909, p. 1052 et II, p. 723.
- LE BOURNELLÈS et SEDALLIAN. — *Précis d'Immunologie*, Paris, Masson, 1929.
- LEULIER, SÉDALLIAN et CLAVEL (M<sup>me</sup>). — Répartition et stabilité des propriétés antigènes de la toxine diphtérique. Rôle des colloïdes non spécifiques. *C. R. Acad. des Sciences*, 1928, 187, 1297.
- Etudes sur la toxine diphtérique. Analyse chimique et analyse biologique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, 11, 413, 436.
- Sur la formation de la toxine et de l'anatoxine diphtériques. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, 100, 679.
- LÖWENSTEIN. — Toxine und toxoïde. *Urban und Schwarzenberg*, Berlin, 1930.
- MADSEN (Th.) et SCHMIDT (S.). — Sur l'avidité du sérum antidiphtérique. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1926, 40, pp. 300-302.
- Flocculation entre la toxine et l'antitoxine diphtériques et standardisation de l'anatoxine. *Extrait des C. R. de la Soc. Danoise de Biologie*, 1932, p. 882.
- Toxine et antitoxine diphtériques, 1930.
- MARTIN. — *Société de Biologie*, C. R. 1923, LXXXVIII, p. 305.
- MARTIN (L.). — Médicaments microbiens. *Bibliothèque de Thérapeutique de Gilbert et Carnot*, 1912.
- MARX. — *Zeitschrift für Hyg.*, 1901, 38.
- MOLONEY and BECHER WELD. — Diphtheria toxin-antitoxin flocculation. *Journ. Path. and Bact.*, 1925, 28, pp. 655-672.

- MÖRCH. — Le principe flocculant du sérum antidiphtérique.  
*Extrait des séances de la Soc. Danoise de Biologie*, 1931,  
7, CVIII, p. 562.
- NICOLLE, CESARI, DEBAINS. — *C. R. Acad. des Sciences*, 29-  
12-19.
- *Annales de l'Institut Pasteur*, 1920, pp. 148, 396, 709.
- NICOLLE et CESARI. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1922, p.  
463.
- NUTTAL et INCHLEY. — *Journ. of Hygiène*, 1904, p. 201.
- RAMON. — *Compte Rendu Soc. de Biologie*, 1922, 86, pp. 661,  
711, 813. — 1923, 88, pp. 167-267. — 1924, 179-422.
- *Annales de l'Institut Pasteur*, 1923, 37, 1001. —  
1924, 38, 1. — 1925, 33, 1. — 1926, 40, 1.
- *Compte rendu Acad. Sciences*, 1923, p. 267. — 1924,  
p. 422.
- RAMON, DEBRÉ, M. et G. MOZER. — *C. R. Soc. Biologie*,  
30 mai 1931, T. CVIII, p. 485.
- RAMON et DEBRÉ. — *Annales de Médecine*, T. XXIX, n° 5,  
mai 1931.
- RAMON. — *Annales I. P.*, T. XLV, 1930.
- RENAUX. — *C. R. Soc. de Biologie*, 1923, pp. 298-299.
- ROUX. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1888, p. 629. — 1889,  
p. 273. — 1890, p. 385. — 1894, pp. 609 et 722.
- *X<sup>e</sup> Congrès International d'Hygiène et de Démogra-  
phie*, 1900.
- SCHMIDT. — *C. R. Académie des Sciences*, 1927, 185, 1080.
- *Annales de l'Institut Pasteur*, 1928, pp. 63-105.
- *C. R. Soc. de Biologie*, 1923.
- Sur la réaction tox-antitox. Action de l'antitoxine  
sur la toxine. *Extrait des C. R. des séances de la Soc.  
Danoise de Biologie*, 1930, T. CIII, p. 272.
- Sur l'affinité entre toxine et antitoxine, 1930, T. CV,  
p. 94.
- Sur l'avidité de l'antitoxine diphtérique naturelle,  
1930, T. CIII, p. 1299.

SCHMIDT und SCHOLZ. — Studien zur Kenntniss der eigenschaften von Diphtheria toxin-antitoxin. Gemischen. *Arch. für Hyg.*, 1925, 95, pp. 308-320.

VON DUNGERN. — *Centrallb. f. Bakter I. origin.*, 34, n° 4, p. 355.

WIDAL-TEISSIER. — *Traité de Médecine*, T. II.

*Bulletin de l'Office International d'Hygiène Publique* (Réglementation des sérums).

## TABLE DES MATIERES

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION .....                                                                                   | 9  |
| La méthode de Roux.....                                                                              | 15 |
| La méthode d'Ehrlich.....                                                                            | 19 |
| Le principe du titrage. — La recherche de la dose (Lo).                                              | 22 |
| Le phénomène d'Ehrlich.....                                                                          | 24 |
| La dose limite mortelle (L+).....                                                                    | 27 |
| Le titrage en pratique.....                                                                          | 28 |
| Comparaison des unités allemande et américaine (tableau).                                            | 30 |
| La méthode de Ramon.....                                                                             | 35 |
| Le phénomène de floculation. — Historique.....                                                       | 35 |
| La floculation dans les mélanges toxine. — Sérum<br>antidiphthérique. — Sa signification.....        | 37 |
| Le dosage du sérum antidiphthérique par la floculation.                                              | 40 |
| Propriété floculante de la toxine et de l'antitoxine<br>diphthériques dans la réaction de Ramon..... | 46 |
| Les titrages comparatifs effectués au moyen des deux<br>méthodes .....                               | 50 |
| « L'avidité ». Le titrage par la méthode de Madsen et<br>Schmidt .....                               | 61 |
| Les autres méthodes de titrage.....                                                                  | 71 |
| La méthode de Marx.....                                                                              | 71 |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| La méthode de Behring.....                                                 | 72 |
| La méthode de Röhmer.....                                                  | 73 |
| La méthode de Ramon et Debré.....                                          | 73 |
| Etude comparée des méthodes de titrage du sérum anti-<br>diphtérique ..... | 77 |
| La méthode d'Ehrlich.....                                                  | 77 |
| La méthode de Ramon.....                                                   | 80 |
| Etude comparative des titrages par les deux méthodes                       | 82 |
| CONCLUSIONS .....                                                          | 89 |
| BIBLIOGRAPHIE .....                                                        | 91 |



